bacteriologie medicală

SUB REDACȚIA PROF. N. NESTORESCU

EDITURA MEDICALĂ

bacteriologie medicală

SUB REDACȚIA PROF. N. NESTORESCU

Membru corespondent al Academiei R.P.R.

AUTORI:

Dr. ANDREESCU VIORICA dr. BALDOVIN-AGAPI CORALIA, conf. BÎLBÎIE V., prof. BOER L., dr. DIMITRIU OFELIA, prof. GAIGINSCHI ALEXANDRINA, dr. GEORGESCU COLETTE, dr. IEREMIA T., dr. MAXIMESCU PAULA, dr. MEITERT T., dr. MESROBEANU LYDIA, prof. NESTORESCU N., dr. OPRESCU C. C., dr. POPESCU A., dr. POPOVICI MARCELLA, conf. POZSGI N., dr. SĂSĂRMAN AL., dr. SEFER M., dr. TĂUTU P., conf. ZARNEA GH.

Ediția a II-a

EDITURA MEDICALĂ
BUCUREȘTI 1965

TABLA DE MATERII

Pag.

- Prefață la Ediția a doua 9
- Prefață la Ediția întîia 11

Partea I

BACTERIOLOGIE GENERALĂ

- **Istoricul bacteriologiei medicale** 15
  - Dezvoltarea microbiologiei romînești 31
- **Morfologie bacteriană** 47
  - Aparatura optică 75
  - Coloranți și metode de colorare 87
  - Microscopia cu fluorescență în bacteriologia medicală 101
- **Fiziologie bacteriană** 118
- **Creșterea, multiplicarea și moartea bacteriilor** 149
- **Acțiunea agenților fizici și chimici asupra bacteriilor** 157
  - Agenți fizici 157
  - Agenți chimici 164
- **Acțiunea agenților biologici asupra bacteriilor** 172
  - Relațiile dintre microorganisme cu referințe particulare asupra antagonismului bacterian microbian 172
  - Antibioticele 178
  - Bacteriofagul și fenomenele de bacteriofagie 197
  - Colicinele și alte bacteriocine 215
- **Elemente de genetică microbiană** 219
- **Biologia, patologia și folosirea animalelor de laborator** 234
- **Tehnici generale pentru studiul bacteriilor** 262
  - Pregătirea și sterilizarea materialului de laborator 262
  - Mediile de cultură 270
  - Tehnici de însămînțare și izolare a bacteriilor 277
  - Metode de conservare a bacteriilor 285
- **Recoltarea produselor în vederea examenelor bacteriologice** 288

Partea a II-a

PROCESUL INFECȚIOS, IMUNITATEA ȘI ALERGIA

- **Procesul infecțios** 297
- **Rezistența naturală față de infecție** 318
  - **Imunitatea dobîndită** 340

Pag.
Rolul sistemului nervos în procesul infecțios și imunitate 368
Fenomenele de sensibilizare imunobiologică : anafilaxia și alergia 375

Partea a III-a

BACTERIOLOGIE SPECIALĂ

Clasificarea și nomenclatura bacteriilor 389

Familia *Micrococcaceae*

Genul *Staphylococcus* și infecțiile stafilococice 395
Genul *Micrococcus* 414
Genul *Sarcina* 415
Genul *Streptococcus* și infecțiile streptococice 416

Familia *Lactobacillaceae*

Genul *Diplococcus* 443
Pneumococul și infecțiile pneumococice. 443
Genul *Leuconostoc* 453

Familia *Neisseriaceae*

Genul *Neisseria* 455
Neisseria meningitidis și infecțiile meningococice 455
Neisseria gonorrhoeae și infecțiile gonococice 465
Familia *Enterobacteriaceae* 474
Genul (grupul) *Shigella* și infecția dizenterică 489
Genul (grupul) *Escherichia* și infecțiile colibacilare 504
Genul (grupul) *Salmonella* și salmonelozele 516
Genul (grupul) *Arizona* și infecțiile specifice 569
Genul (grupul) *Citrobacter* și infecțiile specifice 572
Genul (grupul) *Klebsiella* și infecțiile specifice 575
Genul (grupul) *Aerobacter* ((Enterobacter) 579
Genul (grupul) *Hafnia* 580
Genul (grupul) *Serratia* 580
Genul (grupul) *Proteus* și infecțiile specifice 581
Genul (grupul) *Providencia* 588

Familia *Spirillaceae*

Vibrionul holeric 589

Familia *Pseudomonadaceae*

Genul *Pseudomonas* și infecțiile specifice 601

Familia *Corynebacteriaceae*

Genul *Corynebacterium* și toxiinfecția difterică 609
Genul *Listeria* și listerioza 640

Familia *Mycobacteriaceae*

Genul *Mycobacterium* 646
Mycobacterium tuberculosis și infecția tuberculoasă 646
Mycobacterium leprae și lepra 685

Familia *Brucellaceae*

Genul *Haemophilus* *și* infecțiile specifice 689
Genul *Bordetella* și tusea convulsivă 703

Genul *Pasteurella*

Pasteurella pestis și infecția pestoasă 713
Pasteurella tularensis și tularemia 725
Actinobacillus mallei și infecția morvoasă 732
Genul *Brucella* și infecțiile bruceloase 742

Familia *Bacillaceae*

Genul *Bacillus* 758
B. Anthracis și infecția cărbunoasă 758
Germenii anaerobi patogeni 773
Genul *Ristella* și infecțiile specifice 776
Genul *Spherophorus* și infecțiile specifice 777
Genul *Fusobacterium* și infecțiile specifice 778

Pag.

Genul *Ramibacterium* și infecțiile specifice 779
Genul *Clostridium* și toxiinfecțiile clostridiale (tetanos, gangrenă gazoasă, botulism) 779
Familia *Treponemataceae* 822
Genul Borrelia și febrele recurente 824
Genul *Leptospira* și leptospirozele 828
Genul *Treponema* și treponematozele 842
Familia *Rickettsia* și **rickettsiozele** 861
Familia *Cryptococacceae*
Genul *Candida* și candiozele 921
Bibliografie 934
Index alfabetic 938

Prefaţa la ediţia a doua

Oricărui domeniu științific ne-am adresa, vastul material de informație pe care aproape zilnic ni-l pun la îndemînă periodicele existente de specialitate face ca o carte, oricît de curînd ar fi fost editată, să fie repede depășită.

Apariția celei de a doua ediții a Bacteriologiei medicale se face în condițiile arătate mai sus. Pînă cînd această carte va apărea în fața publicului interesat, cu siguranță că se vor înregistra unele lipsuri.

Noua ediție a Bacteriologiei medicale se caracterizează prin adăugirile inerente fiecărui capitol revăzut și prin întregirea ei cu unele ,,Elemente de genetică microbiană'', indispensabile cunoașterii mai amănunțite a diferitelor mecanisme biologice care se petrec în domeniul eredității și variabilității germenilor microbieni, fenomene care astăzi au o importanță covîrșitoare în microbiologie, în clinica bolilor transmisibile și epidemiologice. Cartea se mai întregește și cu unele metode noi folosite pentru identificarea rapidă a germenilor microbieni, printre care ,,Microscopia cu fluorescență în bacteriologia medicală'' a fost mai larg tratată.

Cum ediția întîia a Bacteriologiei medicale, atît din comunicările făcute de colegii noștri din teren, cît și din informațiile obținute de la cursanții Facultății de perfecționare și specializare, care au folosit-o larg în ultimii ani, a corespuns în mare măsură cerințelor teoretice, practice și didactice, în ediția de față expunerea capitolelor a rămas aceeași. Să sperăm că, în general, cartea va fi utilă celor interesați.

În final îmi fac o plăcută datorie să mulțumesc și pe această cale Editurii medicale, colaboratorilor și prietenilor mei, care m-au ajutat, prin colaborarea și sfaturile lor competente, pentru ca cea de a doua ediție a ,,Bacteriologiei medicale'' să vadă lumina tiparului, în condițiile de față.

Prof. N. NESTORESCU
Membru corespondent al Academiei R.P.R.

Prefaţă la ediţia întîia

Necesitatea unei „Bacteriologii medicale", folositoare studenţilor şi medicilor, era de multă vreme simţită în ţara noastră. La noi există numeroase şi recunoscute competenţe de specialitate. Era necesar numai ca aceşti specialişti să fie adunaţi, convinşi şi mereu susţinuţi de căldura unui entuziasm indispensabil, pentru ca o asemenea lucrare să apară. Şi acest lucru s-a făcut acum. Se pune întrebarea de ce tocmai acum? Fiindcă de această dată, au fost întrunite o serie de condiţii necesare apariţiei ei, şi anume: în primul rînd, încurajarea pe care Ministerul Sănătăţii şi Prevederilor Sociale, direct sau prin Editura medicală, a acordat-o în permanenţă apariţiei ei; în al doilea rînd, înţelegerea şi orientarea adevărată a colectivului nostru, care s-a străduit în cadrul spaţiului acordat, să scoată în evidenţă tot ce ar fi putut servi aspectelor teoretice şi practice ale problemelor tratate; în al treilea rînd, îmbinarea datelor ştiinţifice obţinute din experienţa proprie sau din literatură, cu o interpretare ideologică justă a fenomenelor biologice, pe care o cere expunerea acestor probleme. Se va vedea, de altfel, din lectura diferitelor capitole, interpretarea materialistă şi poziţia justă a colaboratorilor noştri, în problemele dezbătute, în literatura universală, pe care unii autori străini le redau tendenţios sau echivoc.

Ar mai fi o întrebare de pus: a reuşit oare colectivul nostru să răspundă, cel puţin în parte, cerinţelor impuse de apariţia unei asemenea lucrări, care, oricum, pare temerară? Nu ne putem da încă seama, deşi în această privinţă avem unele garanţii. Garanţiile sînt legate de următoarele fapte: aproape întreg colectivul care a colaborat la „Bacteriologia medicală" a crescut şi s-a dezvoltat în Institutul „Dr. I. Cantacuzino", care constituie astăzi cea mai fructuoasă şcoală de microbiologie din ţara noastră. Se ştie că exigenţele unei tradiţii neînduplecate, care nu au permis devierea de la mersul înainte în gîndirea ştiinţifică şi nici abaterea de la o disciplină a muncii, severă uneori, dar necesară, au fost totdeauna caracteristice acestei şcoli. Condiţiile materiale de studiu asigurate Institutului Cantacuzino de Statul nostru reprezintă optimum şi constituie ele înseşi o garanţie în plus. Iată ce asigură în multe privinţe liniştea, greu încercată, de răspunderea deosebită ce o incumbă publicaţia de faţă şi iată pentru ce anume mă simt obligat să aduc *întregului colectiv adînca mea recunoștință pentru munca depusă la elaborarea acestei cărți.*

Fără îndoială, că publicația aceasta, ca oricare alta, probabil, are și lipsuri. Am dori ca ele să nu fie prea mari. Numai cu acest gînd, ne luăm de pe acum întreaga răspundere pentru conținutul fiecărui capitol scris, căruia în opera de redactare definitivă, s-a căutat să i se acorde, în raport cu utilitatea lui, ponderea cuvenită.

Am fi foarte fericiți dacă colegii și specialiștii care vor utiliza „Bacteriologia medicală" ne-ar ajuta cu prețioasele lor sfaturi, oferite în spiritul unei critici constructive, ce ar servi pentru o eventuală îmbunătățire a acestei publicații.

Prof. N. NESTORESCU

PARTEA I

Bacteriologie generală

Istoricul bacteriologiei medicale

Prof. N. Nestorescu şi dr. P. Tăutu

Microbiologia, disciplină tînără, care în afară de medicină, interesează deopotrivă agricultura şi industria, şi-a căpătat repede o poziţie importantă în ierarhia disciplinelor biologice. Microbiologia medicală reprezintă numai un domeniu particular al microbiologiei, în sfera căreia este cuprinsă întreaga cunoaştere asupra celulei bacteriene, indiferent de faptul că este vorba de germeni patogeni sau nepatogeni.

Sub raportul practicii, fiind permanent legată de noi metode de lucru, microbiologia a progresat pe măsură ce, la rîndul lor, celelalte discipline ştiinţifice s-au dezvoltat. Izvorîtă din materialul acelei ştiinţe generale despre natură — al cărei obiect a constituit preocuparea de căpetenie a cercetătorilor antichităţii, evului mediu şi Renaşterii — ea păstrează implicit trăsăturile care caracterizează orice ştiinţe biologice. De altfel, este de prevăzut că şi dezvoltarea sa viitoare este condiţionată de extinderea pe care o vor lua celelalte discipline înrudite.

Nu tot acelaşi lucru se poate spune despre cunoaşterea esenţei fenomenelor şi a concepţiei care stau azi la baza microbiologiei moderne. Esenţa acestor fenomene, ca şi concepţia actuală, nu pot fi înţelese decît dacă sînt analizate în perspectiva istoriei. Microbiologia nu a făcut de prea multă vreme obiectul preocupărilor oamenilor de ştiinţă ; ea nu are o istorie proprie prea amplă. În general, nu putem vorbi despre apariţia unei discipline ştiinţifice decît atunci cînd ea, dedicîndu-se studiului unui domeniu specific bine determinat din natură şi-a creat un sistem logic de cunoştinţe. Acestea din urmă trebuie să fie dobîndite prin procedee sigure de investigaţie, reflectînd realitatea, fiind verificate de practică şi servind practica socială. În asemenea condiţii, pare limpede că microbiologia nu a putut deveni *ştiinţă* decît în etapa consecutivă descoperirii microbilor. Aceasta coincide cu crearea teoriei microbiene de către Louis Pasteur. Pe de altă parte, această disciplină, încadrîndu-se integral în biologie, este firesc ca fenomenele şi teoria ştiinţifică care stau azi la baza microbiologiei să fie analizate în cadrul şi perspectiva istorică a biologiei, care posedă legile sale particulare, ce se încadrează şi se supun legilor generale care prezintă unitatea lumii.

Numai privind din acest unghi vom încerca o analiză istorică a microbiologiei cu intenţia de a oferi o periodizare a dezvoltării ei, pe baza criteriilor logice de constituire a unei ştiinţe. *Scopul cunoaşterii ştiinţifice este obţinerea unor judecăţi care să exprime esenţa obiectului.* Procesul cunoaşterii în microbiologie reprezintă concretizarea procesului general de cunoaştere descris de Lenin: „La început licăresc impresiile, apoi se desprinde *ceva*, după aceea se dezvoltă conceptele *calitate* (determinările lucrurilor sau fenomenelor) şi *cantitate*".

1. Perioada de individualizare ipotetică a factorului determinant al epidemiilor

În faţa marilor flagele care au bîntuit întreaga omenire, cercetătorii naturii şi medicii aparţinînd societăţii sclavagiste sau feudale au încercat să afle cauzele care determină ivirea bolilor cu caracter epidemic. Nu ne vom opri asupra medicilor care s-au situat pe poziţii mistice sau indeterministe, deoarece ei nu au contribuit cu nimic la crearea noului, la constituirea acelui corp de păreri preştiinţifice, de ipoteze în microbiologie. Potrivit concepţiei idealiste religioase dominante, medicina sacerdotală a considerat că bolile au o cauză imaterială, că sînt actul deliberat al unei fiinţe supranaturale. Pentru noi sînt importanţi acei cercetători materialişti ai naturii care au intuit că „o boală nu este nici mai sacră şi nici mai omenească decît alta, ci toate sînt la fel, adică au o pricină materială" (Hippocrat).

Cu toate că şi la alte popoare din antichitate au existat şcoli filozofice materialiste, anumite particularităţi ale societăţii sclavagiste greceşti au determinat aici cu precădere apariţia cercetării filozofico-ştiinţifice, pe baza contemplării directe a unor fenomene din natură. Materialul rudimentar de observaţie, lipsa instrumentelor analitice de investigaţie au fost supleate printr-o gîndire sintetică, întemeiată de multe ori pe analogii, ceea ce lămureşte necesitatea demonstraţiilor logice, diversitatea teoriilor şi abundenţa ipotezelor create.

Influenţaţi de gîndirea atomistă, medicii-filozofi ai antichităţii au creat o imagine asemănătoare cauzei materiale care provoca, după ei, apariţia bolilor cu caracter epidemic: o particulă foarte mică de materie vie. Astfel, în istoria consacrată războiului peloponeziac, istoricul atenian Thucidide explică apariţia unei epidemii printre combatanţi, datorită unei contagiuni „vii" (*contagium animatum*).

Aceeaşi părere este emisă, mai tîrziu, şi de filozoful roman Marcus Terentius Varro. Acesta credea că în regiunile palustre există „animale minuscule" (*animalia minuta*), care, deci, „în nici un caz nu pot să fie vizibile pentru noi" şi care plutesc în aer.

Folosind aceeaşi formulă enciclopedistică, proprie lucrărilor filozofico-ştiinţifice romane, Titus Lucretius Carus vorbeşte în poemul său, „*Despre natura lucrurilor*" (socotit cea mai completă expunere a atomismului antic) — despre „germenii vieţii şi ai morţii". În descrierea ciumei de la Atena, filozoful roman pare a fi însă şi sub înrîurirea teoriei miasmatice a lui Hippocrat: „aceste forţe maligne, aceste epidemii vin, fie din regiuni exterioare, străbătînd cerul ca norii şi pîcla, fie din pămînt, de unde se ridică în masă, cînd solul încărcat de umiditate se descompune sub dubla influenţă a ploilor care s-au abătut şi a arşiţei excesive a soarelui".

Trebuie remarcată, de asemenea, ideea că descompunerea, putrezirea pot fi factori patogeni prin germenii pe care-i liberează. Ea reprezintă o formă materialistă de a explica geneza *spontană* a acestor germeni, geneză care are loc *pe pămînt*, spre deosebire de părerea lui Democrit, care credea că epidemiile apar în urma căderii corpurilor cereşti.

Ipotezele filozofice prezentate mai sus, privind natura cauzelor materiale *externe* ale epidemiilor, pot fi socotite, vorbind teoretic, ca izvoarele viitoarelor cercetări asupra acestor cauze văzute ca o formă aparte de existenţă a materiei. Filozofii naturalişti antici nu au putut privi în amănunt relaţiile dintre cauză şi efect într-un domeniu care va deveni abia peste cîteva secole, un obiect de studiu independent : microbiologia.

Teoria miasmatică a lui Hippocrat este însă o teorie *medicală* asupra epidemiilor ca fenomene multiplu condiţionate. În afară de existenţa unei cauze principale — vag caracterizate prin termenul de ,,miasme morbide'' — sînt incriminaţi încă şi alţi factori care, sau condiţionează anumite particularităţi ale epidemiilor sau, fiind asociaţi cauzei necesare, contribuie la desăvîrşirea efectelor morbide. ,, Faptele care privesc bolile şi cu ajutorul cărora recunoaştem aceste boli le putem afla cercetînd următorii factori : constituţia comună tuturor bolnavilor şi cea individuală, boala, îngrijirea lui, îngrijitorul bolnavului ... starea meteorologică în totalitate ..., obiceiurile, regimul alimentar, felul de viaţă, vîrsta bolnavului'', şi încă altele (*Epidemiile*). Din aceste indicaţii se poate observa mai întîi nevoia unei nosografii corecte, care să permită caracterizarea calitativă a fiecărei boli în parte, şi apoi desprinderea unui factor comun. ,,Cînd un mare număr de oameni sînt pradă aceleiaşi boli, cauza trebuie să fie ceea ce le este comun'' ; şi aceasta, după Hippocrat, este ,,în primul rînd aerul pe care îl respiră''.

Căutarea factorului comun reprezintă, din punct de vedere logic, extragerea universalului din particular (ceea ce dovedeşte depăşirea intuiţiei senzoriale), justificînd rolul atribuit inducţiei de către medicul din Cos şi actul de meditaţie ştiinţifică pe care îl săvîrşeşte acesta lîngă patul bolnavului. Implicaţia practică a teoriei miasmatice este folosirea unor măsuri medicale în stare să modifice, în primul rînd, ,,constituţia epidemică a aerului'', care a determinat probabil recomandarea statornică în caz de epidemie, a fumigaţiilor cu sulf, tămîie şi esenţe aromatice. Totuşi nici apele nu sînt uitate, deoarece unele boli apar la oamenii ,,care beau apă de pretutindeni'' sau folosesc ,,ape alterate aduse de la distanţă''. De aceea, Hippocrat arată că apa de ploaie ,,trebuie fiartă şi filtrată'' (*Despre ape, aer şi locuri*).

Hippocrat vede natura omului în întreaga diversitate a manifestărilor ei şi susţine că această natură (*physis*) nu poate fi cunoscută ,,în niciun alt mod decît prin medicină'' (*Despre vechea medicină*). Afirmaţia sa exprimă efortul de a constitui o medicină nouă ca o ştiinţă particulară, de sine stătătoare.

Deoarece factorii de mediu sînt în strînsă legătură cu natura omului, în urma modificării acestui raport în caz de boală, medicul trebuie să aprecieze momentele favorabile şi defavorabile din evoluţia fiecărei boli. ,,Cercetînd astfel şi cunoscînd de mai înainte toate elementele prielnice, medicul va cunoaşte în mod temeinic fiecare lucru, va influenţa adeseori sănătatea şi va îndruma, prin meşteşugul său, pe calea cea justă'' (*Despre* *ape, aer şi locuri*). Astfel se naşte ideea profilaxiei bolilor şi a complicaţiilor lor. Actul profilactic al medicului hippocratic este bazat deci pe *carios*: momentul prielnic unei acţiuni sau acţiune executată cu măsură şi la timp. Germenii *igienei şi epidemiologiei* se găsesc astfel în opera lui Hippocrat, iar S. V. Moiseev nu ezită să numească tratatul „*Despre aer, ape şi locuri*" drept „prima lucrare de igienă".

Fără îndoială că în istoria medicinei antice, încă înainte de Hippocrat, există numeroase indicii despre existenţa unor principii igienice şi epidemiologice. Bizuindu-se pe experienţa multiseculară a popoarelor şi pe stabilirea unor raporturi (nu totdeauna esenţiale) între comportamentul oamenilor şi apariţia epidemiilor, conducătorii administrativi au impus o serie de măsuri sanitare importante. Se pot cita astfel întreţinerea curăţeniei pe străzi şi în case, stabilirea unor norme de igienă corporală, protecţia fîntînilor, izolarea unor bolnavi şi chiar spitalizarea lor, menţinerea igienei în colectivităţile mari (tabere militare, aşezări periodice de sclavi) etc.

De asemenea, se constată că popoarelor antice le erau cunoscute şi unele elemente de *imunologie*. Una din primele observaţii asupra imunităţii dobîndite aparţine lui Thucidide, care menţionează că acei care au scăpat teferi după o boală contagioasă nu se mai îmbolnăvesc a doua oară. Mai mult încă, la unele popoare — chinezi, indieni — era cunoscută variolizarea, metodă de vaccinare cu material patologic uman.

Cu toate acestea, epidemii numeroase şi întinse au fost consemnate de-a lungul secolelor, după unii istoria Evului Mediu fiind, din acest punct de vedere, istoria marilor epidemii. Eficacitatea măsurilor sanitare era destul de limitată, deoarece limitată era însăşi cunoaşterea naturii. De îndată ce medicina se îndepărta de la adunarea faptelor sau de la analiza lucrurilor evidente, ea era obligată să reia vechile ipoteze, sau să creeze altele noi. Ideea existenţei unor agenţi patogeni vii este susţinută mai departe de unii naturalişti cu spirit enciclopedic, cum au fost agronomul Lucius Junius Moderatus Columella (sec. I), Georg Bauer (Agriccola) (1494 — 1555) şi Girolamo Mercurialis (1530 — 1606). Trebuie să recunoaştem însă că această teorie nu a avut o mare însemnătate în medicină.

Ea nu izbutea, în primul rînd, să aducă soluţii practice, structura şi comportamentul germenilor vii fiind total ignorate. Această situaţie a făcut ca datele empirice de epidemiologie, imunologie şi chiar de igienă să rămînă în aceeaşi stare, dezvoltarea lor ştiinţifică fiind posibilă cu adevărat abia în era bacteriologică a medicinei.

În al doilea rînd, ipoteza germenilor vii a fost pusă în umbră de teoria miasmatică a lui Hippocrat care a avut un mare răsunet în lumea medicală. Claudius Galen (130 — 200) o impune la Roma şi ea va reprezenta pentru civilizaţia romană, arabă şi pentru întreg Evul Mediu concepţia cea mai autorizată. În perioada feudalismului timpuriu, popoarele din Orient — şi în special cele din califatul arab — reuşesc să acumuleze un mare număr de cunoştinţe, sintetizînd cele mai importante date obţinute de civilizaţiile chineză, indiană, greacă şi romană. Printre cei mai de seamă medici ai epocii, Ibn Sina (Avicenna) (980 — 1037) posedă cunoştinţe multilaterale. El descrie multe boli contagioase, individualizîndu-le. În Occident, între anii 1100 şi 1300, şcolile medicale de la Salerno (supranumit „oraşul lui Hippocrat") şi de la Montpellier încearcă să descopere noi cunoştinţe din „ideile naturii însăşi" şi „învaţă igiena pe cei sănătoşi".

În sfîrşit, în al treilea rînd, în Evul Mediu îşi face loc treptat o altă concepţie asupra epidemiilor, şi anume aceea a *contagiunii*. Experienţa acumulată în cursul epidemiilor de ciumă, variolă şi în special apariţia sifilisului în Europa conduc la ideea transmiterii unor boli de la om la om. Această idee se cristalizează în opera lui Girolamo Fracastoro (1478 – 1553), discipol al lui Copernic şi al filozofului materialist Pietro Pomponazzi. Este interesant de semnalat că ideea contagiului nu este nici ea absolut nouă; practica *izolării* (aplicată din cele mai vechi timpuri) o subînţelege. Termenul însuşi aparţine, se pare, lui Titus Livius. În anul 1546, Fracastoro tipăreşte la Veneţia lucrarea sa „*De contagionibus, de morbis contagiosis et eorum curatione*”, în care distinge 3 moduri de contagiune: prin contact direct, de la om la om (ca în cazul leprei, rîiei şi ftiziei), prin contact indirect sau prin „*fomite*” (denumire prin care înţelege hainele şi lenjeria bolnavului) şi, în sfîrşit, prin contagiu la distanţă (ciuma, variola). Fracastoro crede şi el în existenţa unor germeni vii (numiţi de el „seminaria prima”), care se perpetuează prin înmulţire. Fapt cu totul nou, medicul italian introduce aici principiul afinităţii — sau atracţiei elective — considerînd că germenii vii pot avea afinitate numai pentru unele animale sau pentru unele organe. Ipoteze asemănătoare a avut de altfel şi Paracelsius, pe care unii istorici îl aşază alături de Fracastoro, în raport cu ideile sale asupra epidemiologiei şi medicinei muncii.

Teoria lui Fracastoro nu a înlocuit însă teoria miasmatică. Ambele teorii au coexistat multă vreme, aşa încît, în 1853, Henle scria: „De cum apare o epidemie, medicii se împart în două tabere: tabăra partizanilor miasmelor şi tabăra partizanilor contagiunii; apoi contagioniştii şi miasmatiştii sfîrşesc prin a cădea la învoială, admiţînd că şi unii şi alţii au dreptate şi că, după felul epidemiei, propagarea se poate face, fie prin miasme, fie prin contagiune”.

Ideea despre contagiu a cunoscut focul verificării practice, ca o trăsătură de unire între logic şi real. Izolarea bolnavilor şi a persoanelor suspecte, arderea rufăriei lor sînt consecinţa imediată a admiterii contagiului direct şi indirect. Medicul din antichitate nu izola decît leproşii; în Evul Mediu această măsură se aplică şi bolnavilor de ciumă, în primul rînd. În 1348 apare la Veneţia un regulament de combatere a ciumei, iar în 1377 la Ragusa se instituie carantina. Teoria lui Fracastoro, elaborată după două secole de la aplicarea acestor măsuri, nu este prin urmare decît practică generalizată.

2. Perioada de cunoaştere nemijlocită a obiectului bacteriologiei

Această perioadă se caracterizează printr-un eveniment central: descoperirea microbilor, urmată de cercetarea lor morfologică şi de explicarea originii lor prin experienţe *in vitro*, făcute cu germenii existenţi întîmplător în apă sau în aer. Asemenea cercetări nu au putut avea loc decît într-o anumită ambianţă socială şi ideologică, în epoca dezvoltării modului capitalist de producţie.

Existenţa unei zone compacte de civilizaţie în Europa, revoluţia antifeudală, dezvoltarea unei producţii industriale capabile să creeze instrumente *noi* de lucru, intensificarea comerţului, importul de invenţii din Orient, răspîndirea culturii prin universităţi şi prin cărţi tipărite, toate acestea devin premisele dezvoltării unei ştiinţe noi, moderne, bazate pe studiul *experimental* al naturii. Ea s-a născut în interiorul manufacturilor, arsenalelor şi atelierelor, fapt dovedit prin interesul cărturarilor pentru acele „arte tehnice" care ocupau cel mai modest loc în cultura medievală. Contactele directe între învăţaţi, discutarea lucrărilor lor tipărite, informarea destul de rapidă asupra descoperirilor din alte ţări se realizează prin întemeierea unor organizaţii ştiinţifice colective, Academiile, adunări savante în care triumfă orientarea experimental-empirică.

Realizările tehnice în domeniul fizicii au contribuit în bună măsură la progresul ştiinţelor biologice, deşi acestea erau abia la începuturile lor. Alături de inventarea instrumentelor de măsurat timpul (ceasornicele mecanice), construirea instrumentelor pentru cercetarea spaţiului — realizate în urma dezvoltării opticii — a oferit o nouă posibilitate de investigaţie a naturii. Tehnica şlefuirii lentilelor şi teoria îmbinării lor duce la crearea lupei, a camerei obscure cu lentilă, la invenţia lunetei şi a microscopului. Ochiul omenesc — elogiat de savanţii Renaşterii şi considerat de Leonardo da Vinci ca izvorul certitudinii în ştiinţă — a căpătat astfel puterea de a cuprinde o scară largă de mărimi, lărgind hotarele universului vizibil.

„Ochiul ochiului nostru", microscopul, a fost inventat probabil pe la 1590 de către doi opticieni olandezi de la Middleburg, Zaccharias şi Hans Jansen. Tubul acestui microscop avea o lungime de doi metri. Ceva mai tîrziu, în orice caz după anul 1610, Galilei construieşte şi el un asemenea instrument.

Tehnica construirii microscoapelor se răspîndeşte, încît şi în Anglia apare un asemenea constructor, Drebbel.

Se pare că denumirea instrumentului a fost făcută destul de prompt, de către Demisciano, de la Academia dei Lincei în 1614, sau de către Johannes Faber von Bamberg. În 1620, în *Novum Organon*, Bacon îl mai numeşte încă *perspicillum*, recomandîndu-l ca un instrument potrivit pentru observarea amănunţită a urinii, sîngelui şi rănilor.

Dar o cercetare organizată a infinitului mic cu ajutorul microscopului nu a fost posibilă chiar de la început. Unii savanţi s-au îndoit de utilitatea lui şi chiar în secolul al XIX-lea medici ca Magendie, de pildă, privesc cu scepticism introducerea lui în laboratoare.

Primele informaţii asupra organismelor monocelulare apar încă din 1565, cînd naturalistul Gessner, de la Zürich, studiază cu ajutorul lupei un foraminifer, *Vaginulina*. Cercetarea la microscop este limitată, nu atît de slaba putere de mărire a instrumentului sau de deficienţele lentilelor sale, cît mai ales de structura fizico-chimică a obiectului studiat. Pentru a putea fi vizibil acest obiect trebuie să reprezinte o fază deosebită de aceea a mediului în care era cuprins (indici de refracţie deosebiţi), deoarece procedeele de preparare şi colorare nu erau cunoscute. Aşa se explică de ce printre structurile microscopice descoperite sînt eritrocitele, spermatozoizii, ovulul, infuzorii şi capilarele sanguine. Unul din punctele principale de sprijin ale biologiei, studiul celulei, este creat o dată cu cercetarea celulei vegetale de către Robert Hooke (*Micrographia sau o anumită descriere fiziologică a celor mai mici corpuri cu ajutorul sticlelor măritoare*, 1665).

Importanţa introducerii noţiunii de ,,celulă’’ în biologie a fost însă umbrită de revelarea unei noi lumi microscopice, lumea microbilor. Este posibil ca această situaţie să se datorească în parte, faptului că rolul celulei nu era deloc lămurit pe cînd lumea microbilor — descoperită prin aplicarea metodei analitico-experimentale de cercetare a naturii — era un nou argument în sprijinul savanţilor materialişti, care afirmau, asemenea lui Galilei, că mulţimea obiectelor de cunoscut este infinită.

O particularitate importantă a descoperirii microbilor, care a avut consecinţe serioase pentru dezvoltarea cercetărilor ulterioare, este aceea că ei au fost găsiţi în materiale pe cale de descompunere. Faptul acesta a dat un anumit sens primelor experienţe de microbiologie, îndreptîndu-le spre căutarea originii microbilor prin geneză spontană, abătîndu-le aşadar de la cercetarea rolului acestor microorganisme în natură.

Folosindu-se de un microscop construit de el însuşi (care mărea, se pare, de 300 de ori), Antonie van Leeuwenhoeck (1632 — 1723) observă existenţa unor organisme mici, vii (*viva animalcula*) în apa de ploaie stătută, în canalele oraşului sau în tartrul dentar. Descrierile sale, însoţite de desene uimitor de exacte au fost trimise Societăţii Regale din Londra între anii 1674 şi 1676, publicate în revista ,,Philosophical Transactions’’ şi apoi reproduse în lucrarea tipărită la Delft, în 1695, *Arcana naturae detecta*.

Cu două decenii înainte, preotul iezuit Athanasius Kircher (1602 — 1680) observase şi el existenţa unor ,,viermişori’’ în produsele descompuse şi — lucru important — în bubonul pestos. Cu toate că observaţia sa nu era exactă — microscopul lui Kircher mărea de 32 de ori şi el nu a văzut probabil decît leucocitele şi microorganisme mai mari decît microbii — ea nu rămîne lipsită de semnificaţie, fiind prima cercetare la microscop care intenţionează să descopere o legătură cauzală între prezenţa unui germen viu şi un proces patologic. Deşi primii microscopişti nu par să-şi pună sarcini precise de cunoaştere, fiind mai mult îndemnaţi să trieze şi să descrie materialul atît de vast pe care-l observau la microscop, totuşi ei au încercat să distingă unele legături cauzale şi să creeze o *nouă metodologie a cercetării* cu microscopul.

Dezbaterile asupra originii microbilor au dus din nou la înfruntarea concepţiilor materialiste şi idealiste în biologie.

Leeuwenhoeck era de părere că germenii observaţi de el provin din aer, deoarece ei nu apar în apa de ploaie proaspăt recoltată. În acelaşi sens vorbeşte şi Louis Joblot, care opreşte pătrunderea germenilor într-o infuzie de fîn printr-o membrană de pergament, iar Martin Terehovski neagă pur şi simplu posibilitatea autogenezei microorganismelor. Majoritatea cercetătorilor naturii, idealişti sau materialişti vulgari, au crezut însă în geneza spontană a microbilor, deoarece, aşa după cum arată A. I. Oparin, ,,pretutindeni unde oamenii au fost martorii apariţiei bruşte şi masive a unor organisme, ei au interpretat-o ca un fenomen de autogeneză a vieţii’’.

Strîngerea dovezilor în favoarea ambelor concepţii a dus la necesitatea organizării unor experienţe demonstrative, din ce în ce mai precise. Aceste experienţe au 3 aspecte caracteristice: 1) ele sînt efectuate cu germeni găsiţi *întîmplător* în mediile organice folosite, germeni a căror biologie este necunoscută (sporularea fiind descrisă mai tîrziu); 2) sînt experienţe *in vitro*, în afara organismului şi 3) urmăresc elucidarea unei singure chestiuni : dacă aerul (sau oxigenul) *singur* determină sau nu organizarea spontană a microorganismelor.

Preotul şi naturalistul scoţian John Tuberville Needham susţine că apariţia germenilor în bulionul de carne de vită se datoreşte acţiunii unei forţe imateriale ,,vegetative'', practic indestructibile chiar sub acţiunea căldurii (*New microscopical discoveries*, 1745). Experienţele lui Lazzaro Spallanzani (1729—1799) arată, dimpotrivă, că mediul organic folosit de Needham nu a fost de la început ,,steril'', conţinînd sămînţa germenilor. În cazul fierberii îndelungate şi a izolării perfecte a recipientului de mediul extern (Needham folosea dopuri de plută), generarea spontană a microorganismelor nu mai este observată. Rezultatele lui Spallanzani nu au convins pe nimeni şi timp de încă un secol naturaliştii şi medicii au continuat să creadă în generaţia spontană a microbilor.

Paralel cu aceste experienţe şi în pas cu perfecţionarea microscopului a început munca de sistematizare a cunoştinţelor despre microorganisme. Analiza morfologică a animalelor descrise de Leeuwenhoeck a antrenat, atît zoologii, cît şi botaniştii vremii, deoarece printre organismele microscopice erau deopotrivă forme vii care aparţineau zoologiei (protozoarele) şi botanicii (alge, ciuperci). În 1735, în *Systema naturae*, cartea de căpătîi a naturaliştilor, Linné a încadrat toate fiinţele microscopice în genul *Haos*, înzestrînd unele din ele cu puteri infernale (*furia infernalis*), care aveau semnificaţia unei activităţi patogene. De altfel, într-o disertaţie despre ,,*Lumea invizibilă*'' el a admis chiar că multe boli contagioase sînt provocate de activitatea unor ,,particule vii''.

Între 1773 şi 1786, naturalistul danez O. Fr. Müller împarte microorganismele în două genuri : *Vibrio* şi *Monas*, împărţind astfel monerele de formele cu organite. Cîteva decenii mai tîrziu în 1838, Christian Godfried Ehrenberg diferenţiază printre ,,infuzorii'' (adică printre organismele găsite în infuzii) un număr de 22 de familii ; trei din ele — *Bacterium*, *Spirillum* şi *Spirochaeta* — cuprind formele microbiene cunoscute (*Infuzoriile ca organisme complete*). Ulterior, F. Cohn, prin clasificarea sa, a pus bazele monomorfismului în microbiologie, susţinînd invariabilitatea formelor microbiene.

În acest studiu al ştiinţelor naturii, unele denumiri sînt încă echivoce, precizîndu-şi treptat conţinutul. În locul termenului general de ,,animalcul'' apar denumiri ceva mai specializate, ca infuzoriu ori protozoar ; în sfîrşit, este creat cuvîntul ,,bacterie'' (Ehrenberg, Cohn) şi apoi, în 1878, Sédillot inventează termenul de ,,microb'' pe care sistematica nu l-a folosit niciodată.

Aproape independent de cercetările naturaliştilor se dezvoltă în această perioadă ideea unei igiene personale, necesară pentru apărarea şi prelungirea vieţii omului. Se pot urmări aici, printre altele, implicaţiile afirmaţiilor lui Fracastoro despre contagiul direct prin bolnavii ,,semănători de boală''. Omul devine ,,un centru de măsuri profilactice'' (după expresia lui G. S. Kuleşa). Acumularea unui număr mare de fapte de observaţie determină caracterul descriptiv-empiric al igienei. Astfel apar tratate fundamentale de igienă, ca ,,*Sistemul poliţiei medicale*'', scris de J. P. Franck, şi ,,*Macrobiotica* (1798) lui Cristofor Wilhelm Hufeland, cel care pune în circulaţie noţiunea de infecţie, în anul 1814.

Secolul al XVIII-lea se încheie cu o realizare empirică genială în domeniul imunologiei. În 1798, Edward Jenner publică rezultatele sale obţinute prin imunizarea artificială a oamenilor împotriva variolei. Bazîndu-se pe o îndelungată experienţă populară şi pe unele observaţii medicale, Jenner inoculează variola vacilor la om, obţinînd o imunizare solidă împotriva variolei umane. Metoda sa de vaccinare (vacca-vacă) înlocuieşte cu mare succes variolizarea, metodă practicată din vechime, care avea un procent ridicat de mortalitate şi făcea din cei inoculaţi profilactic cu variolă umană un focar permanent şi mobil de boală.

Astfel, în urma acumulării unui impresionant număr de fapte, în urma unor descoperiri şi experienţe empirice, reprezentînd prima treaptă a cunoaşterii, va fi posibilă consolidarea microbiologiei ca ştiinţă şi legătura ei raţională cu domeniile apropiate de cercetare. Căci, după părerea lui Claude Bernard, ,,empirismul, în adevăratul său înţeles, reprezintă primul pas pe calea medicinei experimentale''.

3. Perioada închegării sistemului de prime cunoştinţe ştiinţifice

Materialul faptic obţinut pînă în a doua jumătate a secolului al XIX-lea nu era suficient pentru crearea unei teorii ştiinţifice în legătură cu activitatea microbilor. Este limpede astăzi că întemeierea microbiologiei ca ştiinţă independentă a fost posibilă datorită descoperirilor marelui savant francez Louis Pasteur (1822—1895). Aşa cum apreciază filozofii sovietici, concepţia lui Pasteur în problema originii microorganismelor, ca şi toate descoperirile lui ştiinţifice, întăreau în mod obiectiv poziţiile materialismului filozofic şi ale dialecticii'' (Istoria filozofiei, 1959, p. 403). Or, în epoca în care a trăit Pasteur, dialectica devenise singura metodă de gîndire corespunzătoare stadiului de dezvoltare a ştiinţelor naturii. În această epocă ,,ştiinţele empirice ale naturii luară un asemenea avînt şi atinseră rezultate atît de strălucite, încît a fost posibilă nu numai înfrîngerea totală a unilateralităţii mecaniste din secolul al XVIII-lea, dar, prin faptul că se făcuse dovada legăturii existente chiar în natură dintre diversele domenii de cercetare (mecanică, fizică, chimie, biologie etc.), ştiinţele naturii se transformară ele însele, din ştiinţe empirice, în ştiinţe teoretice şi, prin sintetizarea datelor dobîndite, într-un sistem de cunoaştere materialistă a naturii'' (Engels : Dialectica naturii, ESPLP, 1954, p. 197).

Prin experienţe extrem de riguroase, Pasteur a demonstrat realitatea relaţiei cauzale microb-infecţie, ba chiar, mai mult încă, a verificat această cauzalitate, găsind soluţiile cele mai juste pentru combaterea activităţii microbilor ca agenţi patogeni. Alături de marele chimist francez, medicul german Robert Koch (1843—1910) a avut o contribuţie însemnată la fondarea bacteriologiei ştiinţifice. Ambii savanţi au reuşit să realizeze modelul desăvîrşit al unei infecţii experimentale, oricînd reproductibilă în laborator, în care acţionează o cauză unică, un microb ales, *izolat*, capabil să provoace aceleaşi efecte. Pasteur şi Koch au imaginat tehnici noi de lucru, rezolvînd acele probleme tehnice legate de fiziologia microbului. Prin izolarea germenului şi cultivarea lui în afara organismului, urmată apoi de însămînţarea sau reinocularea lui, a fost făcută dovada procesului obiectiv de infecţie microbiană.

Această ordine de lucru a fost exprimată de către Koch (sau, după Moşkovski, de către maestrul acestuia, Henle), prin trei postulate, stabilite între 1878 şi 1884 : 1) microbul se găseşte în toate organismele care au prezentat aceleaşi semne de îmbolnăvire ; 2) el se izolează şi se menţine în culturi pure ; 3) în aceste condiţii, el reproduce o infecţie experimentală, asemănătoare sau identică cu infecţia naturală. Concepţia rigidă a lui Koch a fost aspru criticată, printre alţii de către Virchow şi Botkin, deoarece organismul viu era văzut astfel ,,ca un corp inert, în care microbii pot să crească tot atît de uşor ca şi într-o eprubetă cu gelatină”.

Spre deosebire de Koch, Pasteur sta pe poziţii biologice largi, intenţionînd să studieze condiţiile de existenţă ale microbului şi să urmărească totodată reacţiile diferitelor specii de animale faţă de acelaşi germen.

În faza în care se găseau aceste cercetări, accentul trebuia pus însă pe dovedirea activităţii patogene a microbilor. Din această cauză primele experienţe în bacteriologie au realizat un singur tip de infecţie cu trei calităţi necesare : *a*) infecţii primare, provocate numai de un anumit germen ; *b*) infecţii generale, răspîndite în întreg organismul, de preferinţă septicemii ; *c*) infecţii supraacute sau acute care să omoare în mod sigur animalul. Modul acesta de cercetare reprezenta experienţa crucială în bacteriologie.

Superioritatea cercetării experimentale întreprinse de Pasteur şi Koch este incontestabilă şi nici unul dintre numeroşii precursori ai celor doi savanţi nu a realizat întregul proces al cunoaşterii ştiinţifice în microbiologie. Încă înaintea lor, unii contemporani a emis ipoteza asupra originii microbiene a bolilor infecţioase, sau chiar au făcut demonstraţii microscopice în acest sens. Aceste ipoteze şi demonstraţii nu s-au impus însă, fie din cauză că au fost discreditate cu uşurinţă, fie datorită faptului că descoperirea unui germen într-un material patologic nu reprezenta o dovadă suficientă a patogenităţii lui. Mai mult încă, deoarece microbii găsiţi în aceste materiale patologice nu puteau fi bine diferenţiaţi morfologic unii de alţii, s-a crezut că toţi germenii întîlniţi în diferite boli nu constituiau decît o singură specie, care, în urma unui proces de adaptare, putea să prezinte uşoare şi neînsemnate modificări. Iată de ce, încă în 1873, Billroth vorbea despre specia *Coccobacteria septica* prezentă sub diferite forme în plăgile infectate.

Printre cei mai remarcabili precursori ai lui Pasteur trebuie menţionat în primul rînd Agostino Bassi (1773—1856), care a generalizat admirabil experienţa sa asupra unei boli a viermilor de mătase, preconizînd acţiuni corecte de antisepsie şi igienă. De asemenea, trebuie citaţi Jean Hameau şi mai ales Jacob Henle, precum şi medicul maghiar Ignatz Filip Semmelweis care, susţinînd ideea infecţiozităţii în febra puerperală, a luat măsuri potrivite de antisepsie, menite să stingă acel focar mobil de contagiu, mîinile medicilor.

Seria descoperirilor la microscop începe — probabil — din anul 1837, cînd Donne descoperă nişte vibroni într-o leziune sifilitică. În 1838 Delafond observă bacteridia cărbunoasă, iar Bassi, muscardina viermilor de mătase ; în 1839, Schönlein descoperă agentul patogen al favusului ; în 1850, Rayer şi Davaine se întîlnesc din nou cu bacilii cărbunoşi ; în

1869, Obermeyer descoperă germenul febrei recurente etc. Tot în această perioadă au loc două experiențe memorabile: reproducerea infecției tuberculoase la iepure prin inoculare intravenoasă de material patologic (Klenke, 1843) sau prin inhalarea microbilor din sputa uscată (Villemin, 1865).

În această perioadă, adică pe la 1856, Pasteur — pe atunci profesor la facultatea de științe din Lille — începe să studieze fermentațiile produse de microorganisme (fermenți „organizați”). Realizînd un mediu sintetic, precum și condițiile necesare sterilității, el reușește să izoleze aceste microorganisme și să reproducă experimental același tip de fermentație. Pasteur dovedește că fermentația este „un act corelativ unui fenomen vital”, o sursă de energie necesară dezvoltării germenilor, care poate exista la nivelul tuturor structurilor vii, și că „o fermentație determinată are fermentul său determinant”. Chimistul francez descoperă fermentația butirică și germenii anaerobi (1861). Astfel este infirmată teoria lui Liebig, după care fermentația este consecutivă descompunerii microorganismelor. Credința lui Robert Boyle (1663) că acel care va ști să arate ce sînt fermenții va descoperi și cauzele unor boli, va fi justificată prin opera lui Pasteur.

Fig. 1. — Louis Pasteur (1822—1895).

Venind în sprijinul industriei franceze, Pasteur dovedește că „bolile“ vinului (1863), berii (1872) și viermilor de mătase (1865—1870) sînt produse de germeni specifici, indicînd de asemenea și soluțiile practice pentru combaterea lor.

În problema genezei spontane a microorganismelor, reactualizată în secolul al XIX-lea de către Pouchet (1859), de elevii acestuia Jolly și Musset, precum și de Henri-Charlton Bastian, marele savant a demonstrat că microorganismele nu iau naștere în mod spontan, ele fiind prezente în atmosferă, în apă și la suprafața corpurilor solide. Cercetările experimentale și concluziile teoretice ale lui Pasteur cu privire la legile nașterii microorganismelor au corespuns în întregime realizărilor științelor naturii din secolul al XIX-lea, îndeosebi ale chimiei organice și ale teoriei evoluționiste. Cu toate că experiențele sale au un caracter negativ, ele au fost comparate de Oparin cu revoluția înfăptuită de Copernic în astronomie.

Consecința medicală a primelor cercetări ale lui Pasteur a fost realizarea metodei antiseptice de către chirurgul englez Lister (1827-1912), considerat de Mecinikov drept unul dintre fondatorii medicinei moderne. Începînd din 1866, Lister aplică în spitalul din Glasgow pansamentul

1869, Obermeyer descoperă germenul febrei recurente etc. Tot în această perioadă au loc două experienţe memorabile: reproducerea infecţiei tuberculoase la iepure prin inoculare intravenoasă de material patologic (Klenke, 1843) sau prin inhalarea microbilor din sputa uscată (Villemin, 1865).

În această perioadă, adică pe la 1856, Pasteur — pe atunci profesor la facultatea de ştiinţe din Lille — începe să studieze fermentaţiile produse de microorganisme (fermenţi „organizaţi"). Realizînd un mediu sintetic, precum şi condiţiile necesare sterilităţii, el reuşeşte să izoleze aceste microorganisme şi să reproducă experimental acelaşi tip de fermentaţie. Pasteur dovedeşte că fermentaţia este „un act corelativ unui fenomen vital", o sursă de energie necesară dezvoltării germenilor, care poate exista la nivelul tuturor structurilor vii, şi că „o fermentaţie determinată are fermentul său determinant". Chimistul francez descoperă fermentaţia butirică şi germenii anaerobi (1861). Astfel este infirmată teoria lui Liebig, după care fermentaţia este consecutivă descompunerii microorganismelor. Credinţa lui Robert Boyle (1663) că acel care va şti să arate ce sînt fermenţii va descoperi şi cauzele unor boli, va fi justificată prin opera lui Pasteur.

Fig. 1. — Louis Pasteur (1822—1895).

Venind în sprijinul industriei franceze, Pasteur dovedeşte că „bolile" vinului (1863), berii (1872) şi viermilor de mătase (1865—1870) sînt produse de germeni specifici, indicînd de asemenea şi soluţiile practice pentru combaterea lor.

În problema genezei spontane a microorganismelor, reactualizată în secolul al XIX-lea de către Pouchet (1859), de elevii acestuia Jolly şi Musset, precum şi de Henri-Charlton Bastian, marele savant a demonstrat că microorganismele nu iau naştere în mod spontan, ele fiind prezente în atmosferă, în apă şi la suprafaţa corpurilor solide. Cercetările experimentale şi concluziile teoretice ale lui Pasteur cu privire la legile naşterii microorganismelor au corespuns în întregime realizărilor ştiinţelor naturii din secolul al XIX-lea, îndeosebi ale chimiei organice şi ale teoriei evoluţioniste. Cu toate că experienţele sale au un caracter negativ, ele au fost comparate de Oparin cu revoluţia înfăptuită de Copernic în astronomie.

Consecinţa medicală a primelor cercetări ale lui Pasteur a fost realizarea metodei antiseptice de către chirurgul englez Lister (1827-1912), considerat de Mecinikov drept unul dintre fondatorii medicinei moderne. Începînd din 1866, Lister aplică în spitalul din Glasgow pansamentul antiseptic cu acid fenic și pulverizează aceeași substanță și în sala de operație. În 1870, Alphonse Guérin inventează pansamentul cu vată. Ulterior, Pasteur preconizează asepsia iar Koch se va ocupa, împreună cu colaboratorii săi, cu studiul dezinfectantelor și mai ales de dezinfecția practicată în cazul epidemiilor. Metoda aseptică va fi aplicată, în 1886, de către chirurgii Bergmann și Schimmelbusch de la Berlin.

Inspirat de cercetările asupra fermenților organizați, Davaine, în 1863 ajunge la concluzia că germenii observați de el în sîngele oilor moarte de dalac ar putea fi „fermenții" acestei boli. Dovada științifică este adusă însă în 1876, de experiențele lui Robert Koch. În vreme ce Koch se ocupă cu rezolvarea unor probleme tehnice, colorarea preparatelor, adoptarea obiectivului cu imersie, fotografierea preparatelor, utilizarea mediilor solide, Pasteur încearcă să rezolve unele probleme teoretice : dovada că bacteridia cărbunoasă nu este efectul dalacului, ci cauza necesară a bolii, inițierea patologiei infecțioase comparate, observarea antagonismului microbian.

Experiențe efectuate cu o cultură veche din bacilii holerei găinilor îl vor conduce pe Pasteur la ideea atenuării virulenței microbilor și la prepararea vaccinului anticărbunos (1881) și apoi a vaccinului antirabic (1885). Vorbind despre Louis Pasteur, savantul rus Timiriazev declară că : „acțiunile lui au revoluționat trei din cele mai vechi arte ale omului. În tehnologie, el a pus o temelie rațională și solidă în toate ramurile care au la bază fermentarea. În agricultură, ideile lui au căpătat o dezvoltare amplă prin lucrările lui Schlessing și Vinogradski. În medicină, el a făcut un pas hotărîtor ; după ce omul a încetat să se teamă de sălbăticiunile pădurilor, n-a fost pas mai hotărîtor ca cel făcut de Pasteur, care l-a învățat pe om să se lupte cu microbii, ființe și mai periculoase încă".

Constituirea unei metode experimentale în microbiologie a dat un impuls nou cercetării cauzelor bolilor infecțioase și tratamentului lor specific. Pasteur descoperă *Cl. septicum* (1887), stafilococul (1880), și vede streptococul și pneumococul ; Koch descoperă *M. tuberculosis* (1882) și *Vibrio comma* (1883) ; rînd pe rînd sînt descoperiți *N. gonorrhoeae* (Neisser, 1879), *S. typhi* (Eberth, 1880), *Esch. coli* (Escherich, 1882), *P.pestis* (Yersin și Kitasato 1894). Descoperirea agentului malariei de către Alphonse Laveran deschide drumul către cercetarea bolilor provocate de protozoare. În primii ani ai secolului al XX-lea se vor descoperi tripanozomele, leishmaniile și treponemele.

Încercarea de a prepara noi vaccinuri și producția de vaccinuri curente devin sarcinile practice ale microbiologilor. Este demn de a fi subliniat faptul că numai la doi ani de la prepararea vaccinului anticărbunos, Lev Simionovici Tenkovski învață să producă singur acest vaccin. Acest biolog rus a creat termenul de „plasmodiu" și a fost unul din adepții teoriei pleomorfismului bacteriilor, teorie greșită, care nega caracterul specific al microbilor. Aproximativ în aceeași perioadă își începe lucrările și Serghei Nikolaevici Vinogradski (1856—1953), întemeietorul bacteriologiei solului, care s-a ocupat de chimiosinteza bacteriilor. În sfîrșit, la un an după aplicarea vaccinului antirabic, în 1886 se organizează prima stațiune pasteuriană la Odesa, condusă de Mecinikov, iar în 1888 — anul în care se deschide Institutul Pasteur—Victor Babeş, la Bucureşti, începe tratamentul antirabic după o metodă proprie.

Sub influenţa avîntului industrial şi graţie sintezei teoretice făcute de Pasteur, bacteriologia s-a dezvoltat furtunos şi a devenit o ştiinţă de sine stătătoare. Ea a contribuit mult la consolidarea tezei despre *originea experimentală a întregului conţinut al gîndirii* şi Pavlov însuşi a dat bacteriologia ca exemplu de ştiinţă experimentală, care deschide largi perspective : „multe procese patologice pot fi reproduse cu uşurinţă în laborator, mai ales datorită succeselor înregistrate de bacteriologie”.

Prin întreaga sa operă, Pasteur contribuie în mare măsură la constituirea unei noi perioade în istoria ştiinţei : apariţia ştiinţei mondiale, care pătrunde în toate domeniile vieţii. Marele savant francez „angajează” ştiinţa în rezolvarea problemelor esenţiale ale omenirii, în problemele vieţii şi ale morţii, ale progresului, libertăţii omului şi păcii. În această etapă apare aspectul nou al muncii de cercetare în colectiv şi al colaborării internaţionale între savanţi. Pe bună dreptate, bacteriologul Kruse susţinea că „progresul ştiinţei în epoca noastră nu se datoreşte atît oamenilor eminenţi izolaţi, cît muncii de strînsă colaborare a mai multor cercetători”.

Microbiologia ştiinţifică a oferit nu numai material de studiu şi probleme noi celorlalte ştiinţe (biochimie, genetică, chimie organică, fizică), dar a mijlocit apariţia unor ştiinţe noi, ca inframicrobiologia, imunologia şi igiena.

Studiind, în 1892, boala mozaicul tutunului şi încercînd să se conducă în cercetările sale după triada Henle-Koch, Dimitri Iosifovici Ivanovski (1864—1919) arată că această boală este provocată de germeni filtrabili, deosebiţi de microorganismele cunoscute pînă atunci. O ipoteză asemănătoare fusese susţinută, în 1886, de către ilustrul bacteriolog Nikolai Feodorovici Gamaleia (1859—1949) în cazul pestei bovine. Astfel începe să se delimiteze domeniul inframicrobiologiei, care va deveni o ştiinţă independentă în primele decenii ale secolului al XX-lea.

Koch a reclamat adesea titlul de igienist, datorită faptului că s-a preocupat în egală măsură şi de combaterea organizată a epidemiilor. Unii istorici îi atribuie invenţia termenului de „purtător sănătos”, care a cristalizat, de fapt, observaţii anterioare. În 1884, Loeffler găseşte bacili difterici în exsudatul faringian al unor persoane sănătoase, şi, după cum se ştie, în 1890 Pasteur observă, în saliva unui copil mort de turbare, pneumococi. M.I.Afanasiev constată primejdia purtătorilor sănătoşi în epidemiile de holeră, iar Gamaleia susţine că „infecţiile virotice latente sînt larg răspîndite la toate speciile de organisme”.

Prepararea vaccinurilor de către Pasteur deschide o etapă nouă în profilaxia bolilor infecţioase şi creează baza experimentală a imunologiei. Condiţiile sale de lucru şi principiile sale biologice l-au făcut să adopte metoda atenuării, însă către sfîrşitul secolului al XIX-lea au mai fost propuse încă două metode : vaccinurile cu germeni omorîţi (Pfeiffer şi Kolle) şi vaccinurile chimice (N. F. Gamaleia). Dacă în privinţa eficacităţii vaccinării, Pasteur a înregistrat succese nepieritoare, el nu a putut să elaboreze, în acea vreme, o idee justă asupra imunizării ; teoria sa despre „epuizarea mediului” exprimă ideea că organismul imun nu mai oferă microbilor un mediu propice dezvoltării lor.

Mecanismele fundamentale ale imunității au fost însă în bună parte descoperite în perioada ultimilor ani ai vieții lui Pasteur. În această problemă s-au înfruntat două școli: școala lui Mecinikov, care sublinia rolul factorilor celulari, și școala cercetătorilor germani, care studia rolul factorilor umorali.

Întemeietorul patologiei comparate, Ilia Ilici Mecinikov (1845–1916), își începe cercetările imunologice prin studiul inflamației la nevertebrate (celebra experiență de la Messina, din 1882). Descoperirea rolului fagocitozei în toată scara animală reprezintă punctul culminant al cercetărilor de filogenie comparată întreprinse de acest mare biolog. După Mecinikov, rolul de apărare al inflamației era condiționat de fagocitoză, dar acest proces a fost supraapreciat pînă la negarea sau diminuarea rolului factorilor umorali (*Nereceptivitatea în bolile infecțioase*, 1903; *Prelegeri asupra patologiei comparate a inflamației*, 1892).

Fig. 2. — Robert Koch (1843—1910).

Fig. 3. — Ilia I. Mecinikov (1845—1916).

Încă din 1881, John Hunter și Lister observaseră că sîngele rezistă la descompunere mult mai bine decît alte țesuturi. În 1887, Fodor stabilește acțiunea bactericidă a sîngelui (asupra bacililor cărbunoși), pe care Buchner o repetă cu ser proaspăt în 1889.

Aceste prime fapte de observație vor constitui începutul experiențelor asupra rolului factorilor umorali în imunitate. Descoperirea exotoxinelor bacteriene (Roux și Yersin, în 1888, Gamaleia în 1889, Kitasato, în 1891) și aflarea mijloacelor de a combate acțiunea lor adaugă noi argumente teoriei umorale. În 1889, Victor Babeș și Lepp susțin posibilitatea vaccinării „cu lichidele și celulele animalelor făcute refractare”, deschizînd calea către imunizarea pasivă, prin practicarea

Mecanismele fundamentale ale imunității au fost însă în bună parte descoperite în perioada ultimilor ani ai vieții lui Pasteur. În această problemă s-au înfruntat două școli: școala lui Mecinikov, care sublinia rolul factorilor celulari, și școala cercetătorilor germani, care studia rolul factorilor umorali.

Întemeietorul patologiei comparate, Ilia Ilici Mecinikov (1845—1916), își începe cercetările imunologice prin studiul inflamației la nevertebrate (celebra experiență de la Messina, din 1882). Descoperirea rolului fagocitozei în toată scara animală reprezintă punctul culminant al cercetărilor de filogenie comparată întreprinse de acest mare biolog. După Mecinikov, rolul de apărare al inflamației era condiționat de fagocitoză, dar acest proces a fost supraapreciat pînă la negarea sau diminuarea rolului factorilor umorali (*Nereceptivitatea în bolile infecțioase*, 1903; *Prelegeri asupra patologiei comparate a inflamației*, 1892).

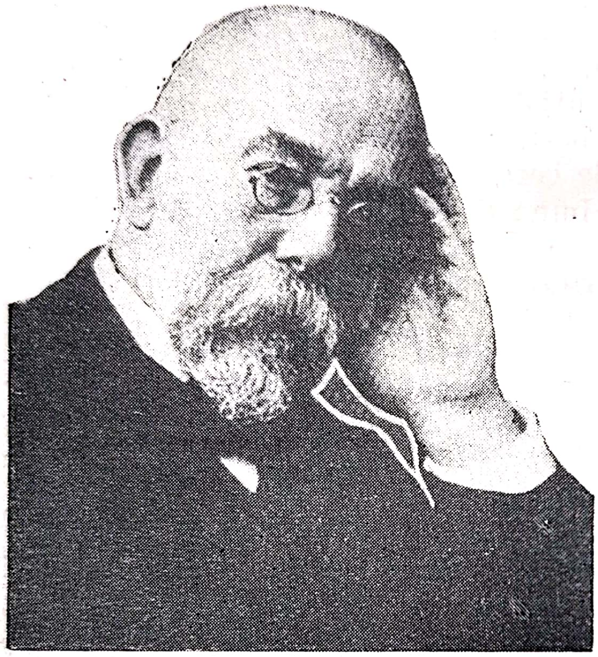


Fig. 2. — Robert Koch (1843—1910).

Fig. 3. — Ilia I. Mecinikov (1845—1916).

Încă din 1881, John Hunter și Lister observaseră că sîngele rezistă la descompunere mult mai bine decît alte țesuturi. În 1887, Fodor stabilește acțiunea bactericidă a sîngelui (asupra bacililor cărbunoși), pe care Buchner o repetă cu ser proaspăt în 1889.

Aceste prime fapte de observație vor constitui începutul experiențelor asupra rolului factorilor umorali în imunitate. Descoperirea exotoxinelor bacteriene (Roux și Yersin, în 1888, Gamaleia în 1889, Kitasato, în 1891) și aflarea mijloacelor de a combate acțiunea lor adaugă noi argumente teoriei umorale. În 1889, Victor Babeș și Lepp susțin posibilitatea vaccinării „cu lichidele și celulele animalelor făcute refractare”, deschizînd calea către imunizarea pasivă, prin practicarea seroterapiei. În acelaşi timp Behring şi Kitasato realizează seroterapia în tetanos şi difterie (1890–1891).

Descoperirea antitoxinelor (anticorpi neutralizanţi) este completată de cunoaşterea altor tipuri de anticorpi: 1) anticorpi coagulanţi, ca aglutininele (Gruber şi Durham, 1896) şi precipitinele (Kraus, 1897); 2) anticorpi peptizanţi, ca bacteriolizinele (Pfeiffer şi Isaeff, 1894) şi hemolizinele (Bordet, 1895). Se realizează astfel un număr mare de reacţii imunologice specifice, care vor constitui baza diagnosticului serologic al bolilor infecţioase.

Concomitent cu aceste descoperiri au fost elaborate teoriile asupra formării anticorpilor şi asupra formării complexului antigen-anticorp. Superioară teoriei lui Buchner (antitoxina este toxină modificată), teoria lui Paul Ehrlich (1854–1915) a avut o mare importanţă în imunologia vremii. Ehrlich consideră că antigenul este fixat de receptori celulari specifici. Această blocare provoacă regenerarea masivă de noi receptori, care, ajungînd în circulaţie, devin anticorpi şi se pot uni chimic cu antigenul respectiv (teoria ,,catenelor laterale'') (1898-1900).

Încercările lui Ehrlich de a combate bolile microbiene cu ajutorul substanţelor chimice, în dorinţa de a realiza o *therapia sterilisans magna*, scot chimioterapia de sub imperiul empirismului. Concretizarea acestui efort uriaş a fost sintetizarea salvarsanului şi neosalvarsanului (1909–1912).

4. Perioada contemporană de dezvoltare prin medieri

Dificultatea unor consideraţii sintetice privind sensurile microbiologiei contemporane este de la sine înţeleasă, şi aceasta cu atît mai mult cu cît interpretarea filozofică în biologie rămîne în urma realizărilor experimentale. Ştiinţa secolului nostru se remarcă prin rapide progrese în tehnică, printr-o remarcabilă înflorire a matematicii, fizicii şi chimiei şi prin apariţia acelor ,,probleme de frontieră'' ivite la punctele de contact dintre mai multe discipline. O altă tendinţă a ştiinţei contemporane este *înnoirea metodologiei*, susţinută de utilizarea unui puternic instrument al raţiunii, metoda dialectică. Putem spune însă că există o trăsătură generală importantă a microbiologiei contemporane şi anume aceea că ea a oferit altor discipline biologice — şi în special biochimiei şi geneticii — un *model* deosebit de util. Microbii (şi nu numai cei patogeni) reprezintă cele mai preţuite sisteme vii pentru cercetări deosebit de fine de enzimologie şi au constituit modelul general pentru noile concepţii în genetică. ,,Cercetările efectuate pe microorganisme ne-au permis abordarea de pe noi poziţii a interpretării legilor geneticii şi au contribuit la continua îmbogăţire a cunoştinţelor noastre despre structurile şi funcţiile elementelor genetice'' (S.I. Alihanean şi colab., 1962).

Fig. 4. — Nikolai F. Gamaleia (1859–1949).

seroterapiei. În acelaşi timp Behring şi Kitasato realizează seroterapia în tetanos şi difterie (1890—1891).

Descoperirea antitoxinelor (anticorpi neutralizanţi) este completată de cunoaşterea altor tipuri de anticorpi: 1) anticorpi coagulanţi, ca aglutininele (Gruber şi Durham, 1896) şi precipitinele (Kraus, 1897); 2) anticorpi peptizanţi, ca bacteriolizinele (Pfeiffer şi Isaeff, 1894) şi hemolizinele (Bordet, 1895). Se realizează astfel un număr mare de reacţii imunologice specifice, care vor constitui baza diagnosticului serologic al bolilor infecţioase.

Concomitent cu aceste descoperiri au fost elaborate teoriile asupra formării anticorpilor şi asupra formării complexului antigen-anticorp. Superioară teoriei lui Buchner (antitoxina este toxină modificată), teoria lui Paul Ehrlich (1854—1915) a avut o mare importanţă în imunologia vremii. Ehrlich consideră că antigenul este fixat de receptori celulari specifici. Această blocare provoacă regenerarea masivă de noi receptori, care, ajungînd în circulaţie, devin anticorpi şi se pot uni chimic cu antigenul respectiv (teoria „catenelor laterale") (1898-1900).

Încercările lui Ehrlich de a combate bolile microbiene cu ajutorul substanţelor chimice, în dorinţa de a realiza o *therapia sterilisans magna*, scot chimioterapia de sub imperiul empirismului. Concretizarea acestui efort uriaş a fost sintetizarea salvarsanului şi neosalvarsanului (1909—1912).

4. Perioada contemporană de dezvoltare prin medieri

Dificultatea unor consideraţii sintetice privind sensurile microbiologiei contemporane este de la sine înţeleasă, şi aceasta cu atît mai mult cu cît interpretarea filozofică în biologie rămîne în urma realizărilor experimentale. Ştiinţa secolului nostru se remarcă prin rapide progrese în tehnică, printr-o remarcabilă înflorire a matematicii, fizicii şi chimiei şi prin apariţia acelor „probleme de frontieră" ivite la punctele de contact dintre mai multe discipline. O altă tendinţă a ştiinţei contemporane este *înnoirea metodologiei*, susţinută de utilizarea unui puternic instrument al raţiunii, metoda dialectică. Putem spune însă că există o trăsătură generală importantă a microbiologiei contemporane şi anume aceea că ea a oferit altor discipline biologice — şi în special biochimiei şi geneticii — un *model* deosebit de util. Microbii (şi nu numai cei patogeni) reprezintă cele mai preţuite sisteme vii pentru cercetări deosebit de fine de enzimologie şi au constituit modelul general pentru noile concepţii în genetică. „Cercetările efectuate pe microorganisme ne-au permis abordarea de pe noi poziţii a interpretării legilor geneticii şi au contribuit la continua îmbogăţire a cunoştinţelor noastre despre structurile şi funcţiile elementelor genetice" (S.I. Alihanean şi colab., 1962).

Fig. 4. — Nikolai F. Gamaleia (1859—1949).

Alături de acest caracter important se află acela al transferului continuu de metode proprii altor ştiinţe în microbiologie, cu ajutorul cărora cunoaşterea noastră se îmbogăţeşte şi capătă adîncime.

Introducerea microscopiei electronice şi a izotopilor radioactivi ca noi metode de lucru în bacteriologie a permis adăugarea de detalii noi în studiul morfologiei şi fiziologiei bacteriilor. Pentru marea majoritate a microbilor cunoscuţi se recunoaşte astăzi o structură celulară şi se descrie chiar sexualitatea la bacterii. Au fost descoperite noi specii microbiene, a fost descoperită originea unor boli infecţioase şi a „bolilor secolului al XX-lea”, s-a dezvoltat studiul microbilor nepatogeni. Observat de Pasteur şi de Gamaleia, fenomenul de bacteriofagie a fost studiat temeinic mai întîi de Frederick William Twort, care l-a denumit „liză transmisibilă” (1915) iar apoi de Felix Hubert d'Hérelle (1917). Descoperirea bacteriofagilor a îndrumat spre cercetarea unor aspecte noi de fiziologie, genetică şi patologie bacteriană şi a adus un element preţios în terapeutica bolilor infecţioase şi mai ales în investigaţiile moderne epidemiologice.

Fig. 5. — Alexander Fleming (1881—1955).

Cercetările de biochimie au elucidat structura chimică a microbilor, tipurile lor de metabolism, echipamentul enzimatic. Studiul mecanismului sintezei proteinelor şi al relaţiei cu metabolismul acizilor nucleici, cercetările asupra „codului” genetic, încercările de a descrie de pe poziţiile ciberneticii sistemele de autoreglare celulară, au fost întreprinse pe material microbiologic. Chimia analitică a reuşit să purifice componenta proteică antigenică şi să cerceteze structura „principiului transformator”. Se realizează astfel genetica şi biochimia *la nivel molecular*.

Descoperirea fenomenului de anafilaxie a atras atenţia asupra modificărilor reactivităţii organismului în prezenţa unei proteine străine. Observat de Magendie (1893) şi de Flexner (1894), el a fost bine studiat de către Richet şi colaboratorii săi (1898—1902). Analiza mecanismelor imunităţii a atras atenţia asupra unei modalităţi noi de apărare a organismelor, prin mucoase. În 1910, N. P. Leaşcenko descoperă acţiunea bactericidă a albuşului de ou. În 1911—1912, Alexander Fleming (1881—1955) descoperă lizozimul în mucusul nazal şi în lacrimi. Această substanţă are o acţiune litică în special faţă de microbii saprofiţi, mai ales faţă de microbul descoperit de Fleming în ser, şi denumit *Micrococcus lysodeicticus*.

Una din cele mai importante descoperiri în microbiologie a fost făcută în anul 1928 de către acelaşi Alexander Fleming, prin care a fost revoluţionată terapeutica bolilor infecţioase. Este vorba de descoperirea penicilinei, urmarea cercetării fenomenului de „antibioză” (termenul aparţine lui Vuilemin, 1889) dintre ciuperca *Penicillium notatum* şi stafilococi. Descoperirea aceasta este capătul unei lungi serii de observaţii

Alături de acest caracter important se află acela al transferului continuu de metode proprii altor științe în microbiologie, cu ajutorul cărora cunoașterea noastră se îmbogățește și capătă adîncime.

Introducerea microscopiei electronice și a izotopilor radioactivi ca noi metode de lucru în bacteriologie a permis adăugarea de detalii noi în studiul morfologiei și fiziologiei bacteriilor. Pentru marea majoritate a microbilor cunoscuți se recunoaște astăzi o structură celulară și se descrie chiar sexualitatea la bacterii. Au fost descoperite noi specii microbiene, a fost descoperită originea unor boli infecțioase și a ,,bolilor secolului al XX-lea'', s-a dezvoltat studiul microbilor nepatogeni. Observat de Pasteur și de Gamaleia, fenomenul de bacteriofagie a fost studiat temeinic mai întîi de Frederick William Twort, care l-a denumit ,,liză transmisibilă'' (1915) iar apoi de Felix Hubert d'Hérelle (1917). Descoperirea bacteriofagilor a îndrumat spre cercetarea unor aspecte noi de fiziologie, genetică și patologie bacteriană și a adus un element prețios în terapeutica bolilor infecțioase și mai ales în investigațiile moderne epidemiologice.

Fig. 5. — Alexander Fleming (1881—1955).

Cercetările de biochimie au elucidat structura chimică a microbilor, tipurilelor de metabolism, echipamentul enzimatic. Studiul mecanismului sintezei proteinelor și al relației cu metabolismul acizilor nucleici, cercetările asupra ,,codului'' genetic, încercările de a descrie de pe pozițiile ciberneticii sistemele de autoreglare celulară, au fost întreprinse pe material microbiologic. Chimia analitică a reușit să purifice componenta proteică antigenică și să cerceteze structura ,,principiului transformator''. Se realizează astfel genetica și biochimia *la nivel molecular*.

Descoperirea fenomenului de anafilaxie a atras atenția asupra modificărilor reactivității organismului în prezența unei proteine străine. Observat de Magendie (1893) și de Flexner (1894), el a fost bine studiat de către Richet și colaboratorii săi (1898—1902). Analiza mecanismelor imunității a atras atenția asupra unei modalități noi de apărare a organismelor, prin mucoase. În 1910, N. P. Leașcenko descoperă acțiunea bactericidă a albușului de ou. În 1911—1912, Alexander Fleming (1881—1955) descoperă lizozimul în mucusul nazal și în lacrimi. Această substanță are o acțiune litică în special față de microbii saprofiți, mai ales față de microbul descoperit de Fleming în ser, și denumit *Micrococcus lysodeicticus*.

Una din cele mai importante descoperiri în microbiologie a fost făcută în anul 1928 de către același Alexander Fleming, prin care a fost revoluționată terapeutica bolilor infecțioase. Este vorba de descoperirea penicilinei, urmarea cercetării fenomenului de ,,antibioză'' (termenul aparține lui Vuilemin, 1889) dintre ciuperca *Penicillium notatum* și stafilococi. Descoperirea aceasta este capătul unei lungi serii de observații anterioare asupra antagonismului dintre microorganisme făcute de Raulin (1862), Viaceslav Oksentravici Manasein (1871), Lister (1871), Polotebnov (1872), Roberts (1874), Tyndall (1876), Pasteur şi Joubert (1877), Babeş (1885), G. Roux şi E. Duchesne (1888–1897) şi Gratia (1925).

Toate eforturile lui Fleming de a obţine penicilina pură sînt zadarnice şi el este silit să asiste, în 1932, la sinteza sulfamidei (realizată de Mietsch şi Klarer şi experimentată de Gerhardt Domagk); iar în 1939, la descoperirea gramicidinei de către René Dubos. O echipă de chimişti şi biologi de la Oxford, echipă condusă de Howard Florey, Ernst Chain şi Heatley, începe, în 1939, purificarea penicilinei. În 1941 sînt cunoscute primele rezultate la om. Tehnica preparării antibioticelor constituie un domeniu aparte. Cercetările în legătură cu punctul de atac al acestor substanţe şi cu substratul biochimic al rezistenţei microorganismelor la antibiotice sînt departe de fi încheiate.

Problemele legate de biologia microbilor — origine, filogenie, variabilitate, ereditate — au iscat de asemenea dispute între partizanii idealismului în biologie şi cercetătorii materialişti.

În sfîrşit, o caracteristică importantă a bacteriologiei moderne este creşterea valorii ei sociale, pe măsura progreselor ştiinţifice, privind viaţa omului. Rezolvarea problemelor de profilaxie, de eradicare a focarelor naturale de infecţie, şi chiar de biologie cosmică (sterilizarea primei rachete care a atins Luna, studiul iradierii cosmice pun ipoteza că în Cosmos nu ar fi exclusă existenţa unor forme bacteriene etc.) pun microbiologia în rîndul ştiinţelor indispensabile activităţii cotidiene a oamenilor.

Dezvoltarea microbiologiei româneşti

Pînă în momentul întemeierii microbiologiei ca ştiinţă, puţini medici romîni şi străini din ţara noastră au avut o activitate practică pe linia sanitară antiepidemică, străduindu-se, în acelaşi timp, să asimileze, să aplice şi să răspîndească cuceririle medicinei europene. Dezvoltarea culturală a ţării a fost frînată vreme de secole de invaziile turceşti, de jugul otoman şi de relaţiile feudale existente. Această situaţie a fost zugrăvită de Gheorghe Lazăr, în 1818 : „Cu ruşine vine unui popor şi neam ce este aşa vechiu, aşa vestit, proslăvit şi înzestrat cu toate rodurile pămîntului ... să nu aibă şi el o şcoală mai de treabă, o Academie cu ştiinţă ...”

Medicina a cunoscut în patria noastră o îndelungată *fază organizatorică*. Această fază îşi începe istoria scrisă aproximativ în timpul închegării primelor state feudale. Începînd din secolul al XIII-lea avem informaţii despre înfiinţarea unor spitale şi bolniţe pentru izolarea şi îngrijirea bolnavilor contagioşi. În „*Istoria igienei în România*” (1901 – 1902), Iacob Felix (1832 – 1905) a strîns un bogat material în legătură cu epidemiologia, practica medicală, instituţiile spitaliceşti şi publicaţiile medicale din ţara noastră.

În secolul al XVIII-lea şi pînă la jumătatea secolului al XIX-lea, Ţările Romîne sînt bîntuite de numeroase epidemii — ciumă, holeră, variolă — care sînt combătute prin mijloace primitive şi prin organizarea de cordoane sanitare. În cursul războaielor ruso-turce, medicii militari ruşi au contribuit cu eficacitate la combaterea acestor epidemii şi la organizarea carantinelor (rolul lui Gustav Orracus în ciuma de la Iaşi, din 1770).

O dată cu părăsirea treptată a empirismului în medicina ţării noastre apar din ce în ce mai mulţi medici „versaţi în filozofia naturală”, care încep să tipărească lucrări de specialitate sau broşuri de popularizare, cuprinzînd sfaturi igienice. În 1800, Constantin Caracaş are ideea vaccinării întregii populaţii a ţării. Un an mai tîrziu, Ferenc Nyulas aplică, în Ardeal, metoda lui Jenner. Datorită acestui proeminent medic ştim că variolizarea a fost practicată şi în ţara noastră de „preoţii valahi” şi că — fapt important — în anumite judeţe exista un sistem popular de vaccinare adevărată : „Vaccinarea se obişnuieşte la noi ... din vremuri atît de vechi, încît nici nu se pot determina. Locuitorii ... ori de cîte ori observă o anumită erupţie pe ugerul unei vaci, o mulg şi cu laptele ei spală ugerul, pentru ca apoi, cu acelaşi lapte, să spele copiii”. În 1804, doctorul Froelich practică în Moldova „hultuirea”, vaccinarea copiilor.

O epidemie de ciumă în 1829 grăbeşte aplicarea măsurilor sanitare prevăzute de Regulamentul Organic, datorită generalului Pavel Kiselev şi consilierilor săi medici. Cu protecţia lui Kiselev se înfiinţează „Cercul ieşan de cetire medicală” şi apoi „Societatea medico-istoriei naturale”, la care participă doctorii M. Zotta şi I. Cihac. Începuturile relaţiilor capitaliste grăbesc organizarea învăţămîntului medical, care fusese întîrziată de boierii feudali înspăimîntaţi — cum spune Kogălniceanu — de „progresul şcoalelor, de ideile naţionale şi liberale”.

Într-o descriere medico-topografică a Ţărilor Romîne, medicul S. Dobronravov enumeră cîteva din bolile curente în funcţie de anotimpuri : „primăvara predomină febrele intermitente zilnice şi terţe ; vara, febrele remitente gastrice şi mai ales biliare ; toamna, diareea simplă şi cea cu sînge ; iarna, în general bolile inflamatoare şi în special cele datorită răcelii” (1835). Arătînd că 4/5 din populaţia Principatelor Unite este lipsită de ajutor medical, Mihail Kogălniceanu scria : „Aşa boalele, mai ales la copii, fac prin satele noastre numeroase şi grozave victime. Boalele epidemice din cînd în cînd înrăurează într-un chip fatal asupra propăşirii populaţiei noastre”.

Cucerirea independenţei de stat întăreşte posibilitatea burgheziei de a dezvolta industria, dar uşurează pătrunderea capitalului străin în ţară. Între anii 1875 şi 1878 s-au creat cercuri revoluţionare care continuă ideile revoluţionar-democratice de la 1848. Aceste cercuri erau alcătuite din intelectuali progresişti, printre care mulţi medici.

„Dezvoltarea medicinei romîneşti spre sfîrşitul secolului al XIX-lea a fost orientată puternic spre concepţia materialistă, în condiţiile create de cuceririle ştiinţifice moderne. Sfîrşitul veacului al XIX-lea şi începutul celui de-al XX-lea se caracterizează, în istoria medicinei romîne, prin întărirea bazelor materiale ale gîndirii medicale şi prin puternicul patriotism al oamenilor de ştiinţă, reprezentanţi ai acestei epoci” (D. Danielopolu, Raport la Sesiunea lărgită a Academiei R.P.R., 1952).

Intrată în *faza ei creatoare*, medicina ţării noastre dă lumii pe primul nostru mare savant : Victor Babeş (1854 — 1926), fondatorul microbiologiei romîneşti. Dar Babeş „nu a fost numai un savant de laborator, ci unul care urmărea să aplice în viaţa de toate zilele descoperirile ştiinţei asupra bolilor infecţioase ... direcţia principală care caracterizează pe acest cercetător şi şcoala pe care a creat-o ... poate fi denumită patomorfologia procesului infecţios. Este sinteza microbiologiei cu histopatologia” ... (S. D. Moşkovski, 1947). Această îmbinare fericită între teorie şi practică a fost o latură caracteristică tuturor microbiologilor romîni.

Babeş îşi începe cariera ştiinţifică la Budapesta ca anatomopatolog, însă, în urma descoperirilor lui Pasteur, este atras de microbiologie, însuşindu-şi metodele de lucru ale tinerii ştiinţe. Între 1881 şi 1884 Babeş se află la Paris, unde lucrează cîtva timp în laboratorul lui Pasteur. Împreună cu profesorul Victor Cornil, el scrie primul tratat de bacteriologie în două volume: „Bacteriile şi rolul lor în etiologia, anatomia şi istologia patologică a bolilor infecţioase” (1885). Încercarea este temerară, pentru că Duclaux — discipolul lui Pasteur — profesor de microbiologie la Facultatea de ştiinţe, nu publicase pînă atunci decît două volume: „*Fermenţii şi bolile*” (1882) şi „*Microbiologia*” (1882), care sînt numai anticipări la marele tratat apărut abia în 1891. În 1883, Babeş cunoaşte pe Mecinikov şi pe Voitov şi comunică lucrările sale asupra căilor de răspîndire a bacililor acidorezistenţi (bacilii tuberculozei şi leprei), precum şi o metodă de diagnostic a tuberculozei genitale. Un an mai tîrziu el se află în laboratoarele lui Koch şi se întoarce la Budapesta în 1885.

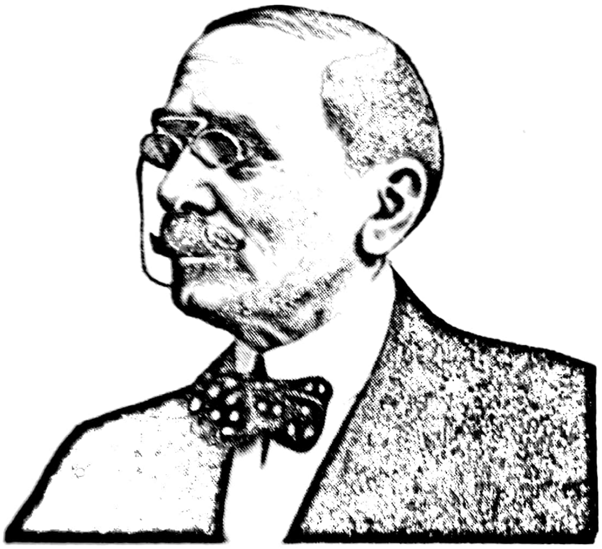


Fig. 6. — Victor Babeş (1854—1926).

În 1887 Babeş este chemat la Bucureşti ca profesor la Catedra de anatomie patologică şi bacteriologie. „Profesorii tineri m-au primit destul de bine, dar în general impresiile mele nu sînt prea satisfăcătoare”, scrie el, observînd influenţa „oligarhiei” politice în ştiinţă.

Activitatea ştiinţifică a savantului romîn cuprinde un număr de peste 1 000 de lucrări. El a inventat o serie de aparate noi şi a descoperit peste 40 de microorganisme patogene, unele dintre ele constituind, în nomenclatura Congresului internaţional de zoologie de la Londra (1900), clasa *Babesia*. Victor Babeş a descoperit corpusculi metacromatici din bacilii difterici (1884) (corpusculii Babeş-Ernst), granulaţiile din bacilii tuberculozei şi leprei (cunoscute ca granulaţiile lui Much), incluziile rabice din celulele nervoase (1887) (corpusculii Babeş-Negri) şi a studiat capsula bacteriană.

Ca şi Pasteur, Babeş este un gînditor în microbiologie. Obiectivele sale nu sînt pur morfologice. „Pasteur şi Koch întemeietorii bacteriologiei, au crezut necesar pentru a da o temelie solidă bacteriologiei, să facă abstracţie de tot ce se întîmplă în jurul infecţiei şi să stabilească specificitatea germenilor patogeni, afirmînd invariabilitatea, atît morfologică, cît şi biologică a germenului ... Însă această ştiinţă o dată solid întemeiată, a venit timpul de a abandona acest punct de vedere exclusiv şi scheacest cercetător şi şcoala pe care a creat-o . . . poate fi denumită patomorfologia procesului infecţios. Este sinteza microbiologiei cu histopatologia" . . . (S. D. Moşkovski, 1947). Această îmbinare fericită între teorie şi practică a fost o latură caracteristică tuturor microbiologilor romîni.

Babeş îşi începe cariera ştiinţifică la Budapesta ca anatomopatolog, însă, în urma descoperirilor lui Pasteur, este atras de microbiologie, însuşindu-şi metodele de lucru ale tinerii ştiinţe. Între 1881 şi 1884 Babeş se află la Paris, unde lucrează cîtva timp în laboratorul lui Pasteur. Împreună cu profesorul Victor Cornil, el scrie primul tratat de bacteriologie în două volume: ,,Bacteriile şi rolul lor în etiologia, anatomia şi istologia patologică a bolilor infecţioase" (1885). Încercarea este temerară, pentru că Duclaux — discipolul lui Pasteur — profesor de microbiologie la Facultatea de ştiinţe, nu publicase pînă atunci decît două volume: ,,*Fermenţii şi bolile*" (1882) şi ,,*Microbiologia*" (1882), care sînt numai anticipări la marele tratat apărut abia în 1891. În 1883, Babeş cunoaşte pe Mecinikov şi pe Voitov şi comunică lucrările sale asupra căilor de răspîndire a bacililor acidorezistenţi (bacilii tuberculozei şi leprei), precum şi o metodă de diagnostic a tuberculozei genitale. Un an mai tîrziu el se află în laboratoarele lui Koch şi se întoarce la Budapesta în 1885.

Fig. 6. — Victor Babeş (1854—1926).

În 1887 Babeş este chemat la Bucureşti ca profesor la Catedra de anatomie patologică şi bacteriologie. ,,Profesorii tineri m-au primit destul de bine, dar în general impresiile mele nu sînt prea satisfăcătoare", scrie el, observînd influenţa ,,oligarhiei" politice în ştiinţă.

Activitatea ştiinţifică a savantului romîn cuprinde un număr de peste 1 000 de lucrări. El a inventat o serie de aparate noi şi a descoperit peste 40 de microorganisme patogene, unele dintre ele constituind, în nomenclatura Congresului internaţional de zoologie de la Londra (1900), clasa *Babesia*. Victor Babeş a descoperit corpusculi metacromatici din bacilii difterici (1884) (corpusculii Babeş-Ernst), granulaţiile din bacilii tuberculozei şi leprei (cunoscute ca granulaţiile lui Much), incluziile rabice din celulele nervoase (1887) (corpusculii Babeş-Negri) şi a studiat capsula bacteriană.

Ca şi Pasteur, Babeş este un gînditor în microbiologie. Obiectivele sale nu sînt pur morfologice. ,,Pasteur şi Koch întemeietorii bacteriologiei, au crezut necesar pentru a da o temelie solidă bacteriologiei, să facă abstracţie de tot ce se întîmplă în jurul infecţiei şi să stabilească specificitatea germenilor patogeni, afirmînd invariabilitatea, atît morfologică, cît şi biologică a germenului . . . Însă această ştiinţă o dată solid întemeiată, a venit timpul de a abandona acest punct de vedere exclusiv şi scheacest cercetător și școala pe care a creat-o ... poate fi denumită patomorfologia procesului infecțios. Este sinteza microbiologiei cu histopatologia" ... (S. D. Moșkovski, 1947). Această îmbinare fericită între teorie și practică a fost o latură caracteristică tuturor microbiologilor romîni.

Babeș își începe cariera științifică la Budapesta ca anatomopatolog, însă, în urma descoperirilor lui Pasteur, este atras de microbiologie, însușindu-și metodele de lucru ale tinerii științe. Între 1881 și 1884 Babeș se află la Paris, unde lucrează cîtva timp în laboratorul lui Pasteur. Împreună cu profesorul Victor Cornil, el scrie primul tratat de bacteriologie în două volume: „Bacteriile și rolul lor în etiologia, anatomia și istologia patologică a bolilor infecțioase" (1885). Încercarea este temerară, pentru că Duclaux — discipolul lui Pasteur — profesor de microbiologie la Facultatea de științe, nu publicase pînă atunci decît două volume: „*Fermenții și bolile*" (1882) și „*Microbiologia*" (1882), care sînt numai anticipări la marele tratat apărut abia în 1891. În 1883, Babeș cunoaște pe Mecinikov și pe Voitov și comunică lucrările sale asupra căilor de răspîndire a bacililor acidorezistenți (bacilii tuberculozei și leprei), precum și o metodă de diagnostic a tuberculozei genitale. Un an mai tîrziu el se află în laboratoarele lui Koch și se întoarce la Budapesta în 1885.

Fig. 6. — Victor Babeș (1854—1926).

În 1887 Babeș este chemat la București ca profesor la Catedra de anatomie patologică și bacteriologie. „Profesorii tineri m-au primit destul de bine, dar în general impresiile mele nu sînt prea satisfăcătoare", scrie el, observînd influența „oligarhiei" politice în știință.

Activitatea științifică a savantului romîn cuprinde un număr de peste 1 000 de lucrări. El a inventat o serie de aparate noi și a descoperit peste 40 de microorganisme patogene, unele dintre ele constituind, în nomenclatura Congresului internațional de zoologie de la Londra (1900), clasa *Babesia.* Victor Babeș a descoperit corpusculi metacromatici din bacilii difterici (1884) (corpusculii Babeș-Ernst), granulațiile din bacilii tuberculozei și leprei (cunoscute ca granulațiile lui Much), incluziile rabice din celulele nervoase (1887) (corpusculii Babeș-Negri) și a studiat capsula bacteriană.

Ca și Pasteur, Babeș este un gînditor în microbiologie. Obiectivele sale nu sînt pur morfologice. „Pasteur și Koch întemeietorii bacteriologiei, au crezut necesar pentru a da o temelie solidă bacteriologiei, să facă abstracție de tot ce se întîmplă în jurul infecției și să stabilească specificitatea germenilor patogeni, afirmînd invariabilitatea, atît morfologică, cît și biologică a germenului ... Însă această știință o dată solid întemeiată, a venit timpul de a abandona acest punct de vedere exclusiv și schematic și a studia, din contra, condițiile în care microbul variază, consecințele acestor variații, precum și condițiile care fac ca bolile infecțioase să se manifeste la diferiți indivizi în mod diferit și pentru ce același microb produce manifestații de grad și de o întindere foarte variată; trebuie, mai departe, să se studieze receptivitatea sau rezistența individului, care influențează microbul, astfel încît produce la diferiți indivizi manifestații deosebite". Acest lung citat invederează înțelegerea dialectică a fenomenului de infecție de care dă dovadă Babeș, înțelegere care i-a permis să contribuie la dezvoltarea microbiologiei moderne. Babeș se opune astfel interpretărilor mecaniciste asupra raporturilor dintre macro- și microorganism, declarîndu-se împotriva concepțiilor unilaterale și simplificatoare. Trebuie semnalat faptul că marile sale lucrări, tratatul de bacteriologie, tratatul asupra turbării (1912) și lucrările asupra pelagrei (1926) au fost distinse cu premii străine.

Victor Babeș a studiat, de asemenea, asociațiile microbiene (1889 — 1890) și a inițiat seroterapia (1889). „Babeș se situează deci printre întemeietorii seroterapiei contemporane — scrie S.D. Moșkovski — iar în lucrările ulterioare consacrate tratamentului și profilaxiei turbării, difteriei și altor infecții, el dezvoltă teoria și practica tratamentului prin seruri . . . Acest admirabil savant a parcurs, împreună cu microbiologia contemporană, drumul glorios de la masa de disecție și eprubete, la elaborarea și organizarea măsurilor în masă, pentru cauza combaterii bolilor infecțioase".

În acest sens se explică efortul intens făcut de Babeș pentru aplicarea cît mai urgentă a vaccinării antirabice și a seroterapiei antidifterice. Romînia a fost cea dintîi țară din lume în care serul antidifteric al lui Babeș a fost aplicat pe o scară întinsă.

Încercările sale de a organiza pe baze noi, cu mijloace eficace, ocrotirea sănătății publice au fost sortite eșecului. „Cauza principală pentru care guvernele noastre nu găsesc acest mijloc este preocuparea lor de interesele personale de partid și deprecierea științelor sanitare".

Așa cum a arătat la Roma, în 1894, la cel de-al XI-lea Congres internațional de medicină, adevărata soluție sanitară nu poate fi alta decît „a pune interesele sanitare ale populației lucrătoare deasupra interesului capitalului și concurenței". Aceste afirmații pun în lumină faptul că Babeș a fost în mod permanent convins de „coeficientul sociologic" al medicinei ca știință despre menținerea sănătății oamenilor. Apariția și extinedrea unor epidemii depind astăzi, într-o măsură oarecare și de forma raporturilor sociale-economice și de relațiile dintre oameni. Cunoscutul om de știință John Bernal spunea, în acest sens, că „cele mai adînci cauze ale bolilor nu constau în bacterii, ci în acele condiții care le-au permis să se înmulțească și să se răspîndească".

Savant patriot, Babeș a declarat că ideea sa călăuzitoare a fost „de a pune știința în serviciul patriei" iar „a avea patrie și a o servi . . . înseamnă . . . . să contribuim din răsputeri pentru progresul omenirii prin calitățile inerente patriei".

Organizatorul școlii romînești de microbiologie umană, Ion Cantacuzino (1863 — 1934) este unul dintre cei mai de seamă biologi experimentatori romîni. Împreună cu Emil Racoviță, D. Voinov, I. Athanasiu, Gh. Marinescu și Fr. Rainer, Ion Cantacuzino a participat la lupta dusă de cercetătorii materialiști împotriva idealismului în biologie, prin aplicarea darwinismului în diferitele discipline biologice. Cunoscînd la Paris pe marii biologi ruşi Kovalevski şi Mecinikov, Ion Cantacuzino lucrează în Institutul Pasteur, în laboratorul lui Mecinikov. Teza sa de doctorat priveşte modul distrugerii vibrionului holeric în organism sub influenţa fagocitelor (1894).

Primele sale cercetări sînt făcute în spiritul biologiei darwiniste, cu concluzia că elaborarea anticorpilor, observată pe toată scara lumii vii, are „caracterul unei legi biologice foarte generale" şi că „legea luptei pentru viaţă îşi găseşte în imunitate expresia sa cea mai evidentă" („Aparate şi funcţii fagocitare în regnul animal", 1896; „Problema imunităţii la nevertebrate", 1923). Cantacuzino dă o interpretare fiziologică reacţiilor de imunitate, reacţii de adaptare-apărare, apropiindu-se de principiul nervismului în imunologie şi combătînd interpretările finaliste asupra fagocitozei. În alte lucrări el a demonstrat unele aspecte ale variabilităţii microbiene şi ereditatea caracterelor dobîndite la unele culturi de streptococi („fenomenul Cantacuzino", 1927).

Fig. 7. — Ion Cantacuzino (1863—1934).

În 1901, Cantacuzino este numit profesor la Catedra de medicină experimentală de la Facultatea de medicină din Bucureşti. Denumirea catedrei corespunde orientării sale juste, deoarece el poate fi socotit unul dintre promotorii metodei experimentale în medicina romînească.

Dar marea operă a lui Ion Cantacuzino este dezvoltarea medicinei preventive în ţara noastră. În laboratorul său se prepară serul antistreptococic (1904), antidizenteric (1905), vaccinul antiholeric (1912), vaccinul antitifo-paratifoidic (1913). Această activitate practică este izvorîtă din realităţile epidemiologice ale ţării noastre în perioada respectivă. Vaccinarea antiholerică a fost considerată de microbiologul rus Aleksandr Mihailovici Besredka drept „marea experienţă romînă, care rivalizează cu cele mai frumoase experienţe făcute vreodată într-un laborator".

O mare parte din activitatea ştiinţifică şi practică a acestui savant a fost îndreptată spre combaterea tuberculozei. Ţara noastră este a doua ţară din lume — după Franţa — în care vaccinarea B.C.G. s-a făcut pe scară largă (1926), la trei ani după descoperirea lui Calmette şi Guérin. La iniţiativa sa au fost înfiinţate sanatoriile de la Bisericani, Bîrnova, Nifon şi Cărbuneşti, ca şi Spitalul „Filaret". În 1933 organizează Liga contra tuberculozei. Călăuzit de ideile socialiste, el s-a ocupat şi de latura carea darwinismului în diferitele discipline biologice. Cunoscînd la Paris pe marii biologi ruşi Kovalevski şi Mecinikov, Ion Cantacuzino lucrează în Institutul Pasteur, în laboratorul lui Mecinikov. Teza sa de doctorat priveşte modul distrugerii vibrionului holeric în organism sub influenţa fagocitelor (1894).

Primele sale cercetări sînt făcute în spiritul biologiei darwiniste, cu concluzia că elaborarea anticorpilor, observată pe toată scara lumii vii, are „caracterul unei legi biologice foarte generale” şi că „legea luptei pentru viaţă îşi găseşte în imunitate expresia sa cea mai evidentă” („Aparate şi funcţii fagocitare în regnul animal”, 1896; „Problema imunităţii la nevertebrate”, 1923). Cantacuzino dă o interpretare fiziologică reacţiilor de imunitate, reacţii de adaptare-apărare, apropiindu-se de principiul nervismului în imunologie şi combătînd interpretările finaliste asupra fagocitozei. În alte lucrări el a demonstrat unele aspecte ale variabilităţii microbiene şi ereditatea caracterelor dobîndite la unele culturi de streptococi („fenomenul Cantacuzino”, 1927).

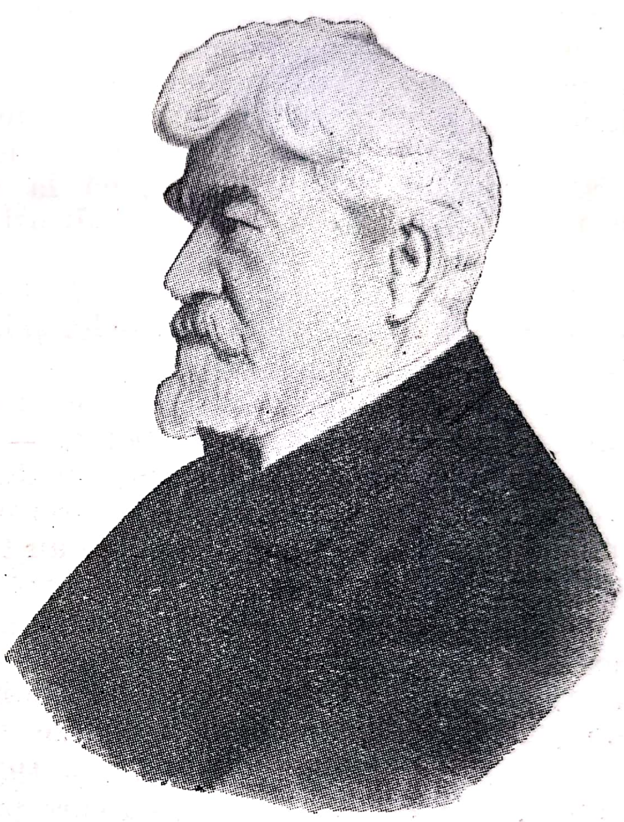


Fig. 7. — Ion Cantacuzino (1863—1934).

În 1901, Cantacuzino este numit profesor la Catedra de medicină experimentală de la Facultatea de medicină din Bucureşti. Denumirea catedrei corespunde orientării sale juste, deoarece el poate fi socotit unul dintre promotorii metodei experimentale în medicina romînească.

Dar marea operă a lui Ion Cantacuzino este dezvoltarea medicinei preventive în ţara noastră. În laboratorul său se prepară serul antistreptococic (1904), antidizenteric (1905), vaccinul antiholeric (1912), vaccinul antitifo-paratifoidic (1913). Această activitate practică este izvorîtă din realităţile epidemiologice ale ţării noastre în perioada respectivă. Vaccinarea antiholerică a fost considerată de microbiologul rus Aleksandr Mihailovici Besredka drept „marea experienţă romînă, care rivalizează cu cele mai frumoase experienţe făcute vreodată într-un laborator”.

O mare parte din activitatea ştiinţifică şi practică a acestui savant a fost îndreptată spre combaterea tuberculozei. Ţara noastră este a doua ţară din lume — după Franţa — în care vaccinarea B.C.G. s-a făcut pe scară largă (1926), la trei ani după descoperirea lui Calmette şi Guérin. La iniţiativa sa au fost înfiinţate sanatoriile de la Bisericani, Bîrnova, Nifon şi Cărbuneşti, ca şi Spitalul „Filaret”. În 1933 organizează Liga contra tuberculozei. Călăuzit de ideile socialiste, el s-a ocupat şi de latura socială a tuberculozei, afirmînd, în 1906, că „stingerea completă a acestei boli numai societatea socialistă, societatea comunistă o va aduce. Pînă atunci însă, trebuie luate măsuri — ateliere igienice, zi de muncă mai mică, repaus regulat, salar îndestulător etc. Cum însă acestea nu le-ar face patronii sau statul de la sine, muncitorimea trebuie să se organizeze în sindicate, pentru revendicarea drepturilor ei”.

După revoluția din 1907, Ion Cantacuzino a condus Direcția sanitară (un minister corespunzător fiind creat abia în 1923). După ce a cunoscut în mod real starea igienică din țară, cercetare realizată de doctorul C. Popescu-Azuga, Cantacuzino a elaborat legea sanitară din 1910 (care a funcționat pînă în 1930). Obiectivele mari ale acestei legi erau : *1*) asigurarea igienei muncii ; *2*) asigurarea igienei în marile colectivități ; 3) lărgirea asistenței medicale pînă la sate ; *4*) popularizarea noțiunilor științifice și medicale la sate ; *5*) asigurarea bazei materiale necesară dezvoltării eficiente a practicii medicale ; 6) apărarea medicilor de abuzurile politicienilor. Următoarele legi elaborate de Cantacuzino au fost îndreptate către protecția gravidelor și lăuzelor și către organizarea muncii în porturi.

Aceste legi cu caracter progresist nu au fost traduse în fapte. Legea sanitară din 1910 „a fost sabotată — scrie Cantacuzino — de generația de politicieni conduși de aspirații materiale, aplicînd în scop de îmbogățire personală cele mai cinice metode politice și administrative. Cele mai multe din măsurile prevăzute nu s-au tradus în fapt. Nu s-au creat instituțiile necesare, nu s-a format personalul necesar”.

Ion Cantacuzino a fost pe deasupra o mare personalitate în cultura noastră și a fost apreciat peste hotare, ca unul din acele „spirite cu vaste cunoștințe, cu o curiozitate fără limite, capabile să îmbrățișeze suma cunoștințelor umane și să exceleze în toate domeniile”.

Constantin Levaditi (1874 — 1953), mai întîi colaborator al lui Victor Babeș (1897 — 1898), cu care publică mai multe lucrări de bacteriologie și histopatologie, a fost mai tîrziu elev și colaborator al lui Mecinikov, de care totdeauna își amintea cu venerație și afecțiune și de care se simțea apropiat ca de un conațional. [Se știe că Mecinikov se trage dintr-o familie coborîtoare din familia vestitului spătar moldovean Nicolae Milescu -Cîrnul (1636 — 1708)]. Pasiunea de cercetare a lui C. Levaditi, izvorîtă în contactul său cu Victor Babeș, s-a dezlănțuit în laboratorul lui Mecinikov, abordînd după aceea, în aproape 60 de ani de activitate științifică, foarte numeroase probleme de bacteriologie, imunologie, inframicrobiologie și chimioterapie. Cercetător remarcabil, în același timp prolific și multilateral, C. Levaditi a publicat peste 750 de lucrări științifice. Cercetările sale în sifilisul experimental sînt îndeobște cunoscute (metoda de colorare a spirililor în sînge, studii asupra spirilozelor găinilor și iepurilor, o metodă proprie de impregnare argentică pentru *Treponema pallidum* în țesuturi, precum și numeroase observații în diferitele faze ale sifilisului etc.). În același timp, cercetările sale asupra originii anticorpilor și ale caracterelor esențiale de patogenitate ale germenilor sînt din ce în ce mai numeroase.

Studiile lui C. Levaditi, privitoare la virusuri, fac parte din preocupările sale științifice, majore. Cu ocazia studiului virusului herpetic pune în lumină concepția sa asupra ectodermozelor neurotrope, în care dovedește

„afinitatea electivă a virusurilor în funcţie de originea embrionară a ţesutului atacat", precizînd totodată şi fenomenele care caracterizează imunitatea în viroze.

Totdeauna doritor să îmbine teoria cu practica şi sensibil la suferinţele bolnavilor, C. Levaditi s-a preocupat vreme îndelungată cu probleme de chimioterapie. El descoperă acţiunea bismutului în tratamentul sifilisului, pentru care a devenit posesorul mult rîvnitei medalii de aur „Paul Ehrlich", şi studiază cu aceeaşi răbdare, deseori cu metode proprii, acţiunea terapeutică a vanadiului, telurului, iridiului, aurului etc.

Fig. 8.—Constantin Levaditi (1874—1953).

Fig. 9.—Alexandru Slătineanu (1873—1939).

Constantin Levaditi, sensibil la ridicarea prestigiului ştiinţei patriei noastre, şi-a întrerupt temporar activitatea sa de cercetare, pentru a organiza şi înnobila dificila sarcină didactică de la Facultatea de medicină din Cluj (1919 — 1920). Cu toate că a trăit mai toată viaţa sa la Paris, lucrînd la Institutul Pasteur şi la Institutul Fournier, a ţinut permanent legătura cu patria sa, pe care a iubit-o totdeauna, mărturie fiind marele număr de elevi romîni pe care i-a format şi care îi duc mai departe gîndirea sa ştiinţifică, îndemînarea sa tehnică şi dragostea neţărmurită pentru progres şi pace.

Prof. Alexandru Slătineanu (1873 — 1939) a fost elevul lui Mecinikov, în laboratorul căruia fusese introdus de către prof. I. Cantacuzino, pe atunci asistent al marelui naturalist rus. În acest laborator şi-a lucrat Al. Slătineanu, timp de cîţiva ani, teza sa de doctorat privitoare la cocobacilul Pfeiffer.

Cercetările lui Al. Slătineanu sînt numeroase ; ele au privit probleme variate, legate mai ales de bolile care bîntuiau ţara noastră în vremurile sale : febra tifoidă, tifosul exantematic, pelagra, malaria, scarlatina, lepra, tuberculoza etc. În tuberculoză, prof. Al. Slătineanu a descoperit reacţia

„afinitatea electivă a virusurilor în funcţie de originea embrionară a ţesutului atacat", precizînd totodată şi fenomenele care caracterizează imunitatea în viroze.

Totdeauna doritor să îmbine teoria cu practica şi sensibil la suferinţele bolnavilor, C. Levaditi s-a preocupat vreme îndelungată cu probleme de chimioterapie. El descoperă acţiunea bismutului în tratamentul sifilisului, pentru care a devenit posesorul mult rîvnitei medalii de aur „Paul Ehrlich", şi studiază cu aceeaşi răbdare, deseori cu metode proprii, acţiunea terapeutică a vanadiului, telurului, iridiului, aurului etc.

Fig. 8.—Constantin Levaditi (1874—1953).

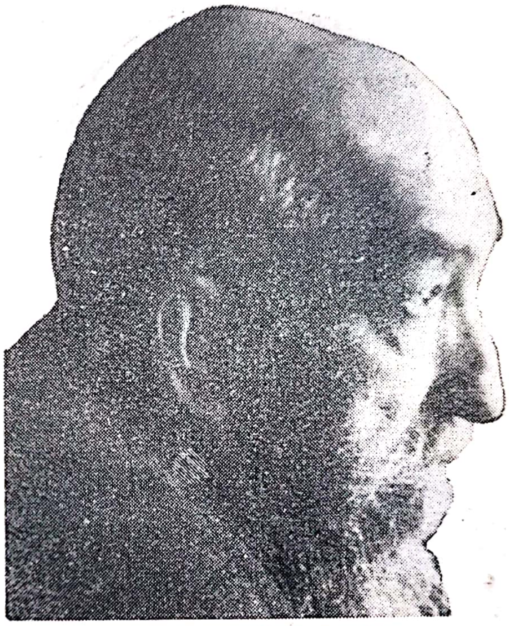


Fig. 9.—Alexandru Slătineanu (1873—1939).

Constantin Levaditi, sensibil la ridicarea prestigiului ştiinţei patriei noastre, şi-a întrerupt temporar activitatea sa de cercetare, pentru a organiza şi înnobila dificila sarcină didactică de la Facultatea de medicină din Cluj (1919 — 1920). Cu toate că a trăit mai toată viaţa sa la Paris, lucrînd la Institutul Pasteur şi la Institutul Fournier, a ţinut permanent legătura cu patria sa, pe care a iubit-o totdeauna, mărturie fiind marele număr de elevi romîni pe care i-a format şi care îi duc mai departe gîndirea sa ştiinţifică, îndemînarea sa tehnică şi dragostea neţărmurită pentru progres şi pace.

Prof. Alexandru Slătineanu (1873 — 1939) a fost elevul lui Mecinikov, în laboratorul căruia fusese introdus de către prof. I. Cantacuzino, pe atunci asistent al marelui naturalist rus. În acest laborator şi-a lucrat Al. Slătineanu, timp de cîţiva ani, teza sa de doctorat privitoare la cocobacilul Pfeiffer.

Cercetările lui Al. Slătineanu sînt numeroase ; ele au privit probleme variate, legate mai ales de bolile care bîntuiau ţara noastră în vremurile sale : febra tifoidă, tifosul exantematic, pelagra, malaria, scarlatina, lepra, tuberculoza etc. În tuberculoză, prof. Al. Slătineanu a descoperit reacţia care îi poartă numele, și anume redeșteptarea oftalmoreacției la tuberculină, după cutireacție și inoculări subcutanate, repetate, practicate cu acest produs biologic.

Fig. 10. — Constantin Ionescu-Mihăești (1883 — 1962).

Dar în afară de calitatea de microbiolog, prof. Al. Slătineanu a fost un mare epidemiolog și un iscusit igienist. El a studiat permanent legile specifice extinderii bolilor transmisibile și sociale. Prof. Al. Slătineanu înțelegea și credea, ca și Ștefan Stîncă de altfel, că printre factorii patologici care întrețin extinderea epidemiilor, factorul social joacă un rol de prim ordin.

Această înțelegere a mecanismelor existente în procesele epidemice era legată de profunda sa pregătire culturală, alimentată de focul pe care îl aprinsese în mintea sa școala politică a lui Jean Jaurés și cuvîntările acestui mare socialist, care „atingeau culmi de elocință supremă” și întrețineau, pentru tinerii romîni aflați la Paris, din generația prof. Slătineanu, „flacăra unor înalte aspirații pentru o lume care, ca să fie mai bună, trebuie să fie mai dreaptă în alcătuirile ei economice”.

Acad. C. Ionescu-Mihăești (1883—1962), elev și colaborator apropiat al prof. I. Cantacuzino, a continuat cercetările de microbiologie și medicină experimentală în spiritul științific al marelui său maestru. Om de mare cultură, îmbrățișînd aspecte multilaterale, a lucrat în numeroase domenii de microbiologie generală privind bacteriile și virusurile. Printre acestea ar trebui reamintite mai ales studiile de imunochimie și cele privind proprietățile biologice ale componentelor *M. tuberculosis.* Cercetările asupra metabolismului variantelor virulente și avirulente (B.C.G.), ca și a variantelor rezistente la tuberculostatice au constituit, de asemenea, o preocupare științifică de seamă a acad. C. Ionescu-Mihăești.

Pe de altă parte, cercetările sale în privința histogenezei leziunilor tuberculoase și a proprietăților imunizante alergizante ale componentelor *M. tuberculosis* (tuberculoproteine, fracțiuni polizaharidice și lipidice), efectuate în vederea preparării de „vaccinuri sintetice antituberculoase”, au deschis orizonturi noi în concepția imunității specifice antituberculoase.

Contribuții importante au fost aduse de către Ionescu-Mihăești în cunoașterea patogeniei bolii Nicolas-Favre. Cercetările sale în domeniul poliomielitei și în special asupra virusurilor poliomielitice au îngăduit ipoteze de genetică microbiană, care au fost mult mai tîrziu explicate și confirmate, în afară de latura practică a problemei, concretizată prin prepararea pentru prima dată în țara noastră a vaccinului antipoliomielitic.

care îi poartă numele, şi anume redeşteptarea oftalmoreacţiei la tuberculină, după cutireacţie şi inoculări subcutanate, repetate, practicate cu acest produs biologic.

Dar în afară de calitatea de microbiolog, prof. Al. Slătineanu a fost un mare epidemiolog şi un iscusit igienist. El a studiat permanent legile specifice extinderii bolilor transmisibile şi sociale. Prof. Al. Slătineanu înţelegea şi credea, ca şi Ştefan Stîncă de altfel, că printre factorii patologici care întreţin extinderea epidemiilor, factorul social joacă un rol de prim ordin.

Această înţelegere a mecanismelor existente în procesele epidemice era legată de profunda sa pregătire culturală, alimentată de focul pe care îl aprinsese în mintea sa şcoala politică a lui Jean Jaurés şi cuvîntările acestui mare socialist, care „atingeau culmi de elocinţă supremă" şi întreţineau, pentru tinerii romîni aflaţi la Paris, din generaţia prof. Slătineanu, „flacăra unor înalte aspiraţii pentru o lume care, ca să fie mai bună, trebuie să fie mai dreaptă în alcătuirile ei economice".

Fig. 10. — Constantin Ionescu-Mihăeşti (1883 — 1962).

Acad. C. Ionescu-Mihăeşti (1883—1962), elev şi colaborator apropiat al prof. I. Cantacuzino, a continuat cercetările de microbiologie şi medicină experimentală în spiritul ştiinţific al marelui său maestru. Om de mare cultură, îmbrăţişînd aspecte multilaterale, a lucrat în numeroase domenii de microbiologie generală privind bacteriile şi virusurile. Printre acestea ar trebui reamintite mai ales studiile de imunochimie şi cele privind proprietăţile biologice ale componentelor *M. tuberculosis.* Cercetările asupra metabolismului variantelor virulente şi avirulente (B.C.G.), ca şi a variantelor rezistente la tuberculostatice au constituit, de asemenea, o preocupare ştiinţifică de seamă a acad. C. Ionescu-Mihăeşti.

Pe de altă parte, cercetările sale în privinţa histogenezei leziunilor tuberculoase şi a proprietăţilor imunizante alergizante ale componentelor *M. tuberculosis* (tuberculoproteine, fracţiuni polizaharidice şi lipidice), efectuate în vederea preparării de „vaccinuri sintetice antituberculoase", au deschis orizonturi noi în concepţia imunităţii specifice antituberculoase.

Contribuţii importante au fost aduse de către Ionescu-Mihăeşti în cunoaşterea patogeniei bolii Nicolas-Favre. Cercetările sale în domeniul poliomielitei şi în special asupra virusurilor poliomielitice au îngăduit ipoteze de genetică microbiană, care au fost mult mai tîrziu explicate şi confirmate, în afară de latura practică a problemei, concretizată prin prepararea pentru prima dată în ţara noastră a vaccinului antipoliomielitic.

Preocupat permanent de problemele de imunitate, el a contribuit, prin lucrări valoroase, la cunoaşterea mecanismelor de imunitate în holeră, tifos exantematic, infecţii streptococice, difterie, antrax etc.

Spirit analitic, sobru şi circumspect faţă de generalizări, prof. Ionescu-Mihăeşti nu îngăduia în gîndirea sa, în metodele sale de lucru, sau în stilul său de exprimare, nici un fel de compromis sau elemente insuficient controlate. El împărţea cu generozitate elevilor şi colaboratorilor cunoştinţele sale, întreţinute permanent de o documentare ştiinţifică, critic selecţionată, precum şi întinsa sa experienţă din domeniul atît de vast al ştiinţelor experimentale.

Pe de altă parte, ca o latură a puternicii sale sensibilităţi, îndreptate spre tot ce umanitatea a reuşit să aducă mai frumos în patrimoniul artei şi literaturii, acad. C. Ionescu-Mihăeşti rămîne în conştiinţa elevilor şi colaboratorilor săi ca un estet desăvîrşit care — prin cunoştinţele, observaţiile şi aprecierile sale, expuse cu un farmec rar întîlnit — a reuşit să înnobileze prieteniile şi să captiveze pe cei din jurul său.

Succesor al prof. Cantacuzino la Catedra de medicină experimentală mai întîi, şi de bacteriologie ulterior, precum şi la direcţia Institutului „Dr. I. Cantacuzino", acad. C. Ionescu-Mihăeşti, în decurs de aproape trei decade, conducînd colective puternice, a format numeroşi elevi, a căror justă orientare microbiologică şi îndemînare este pusă, azi, în slujba construirii socialismului din ţara noastră.

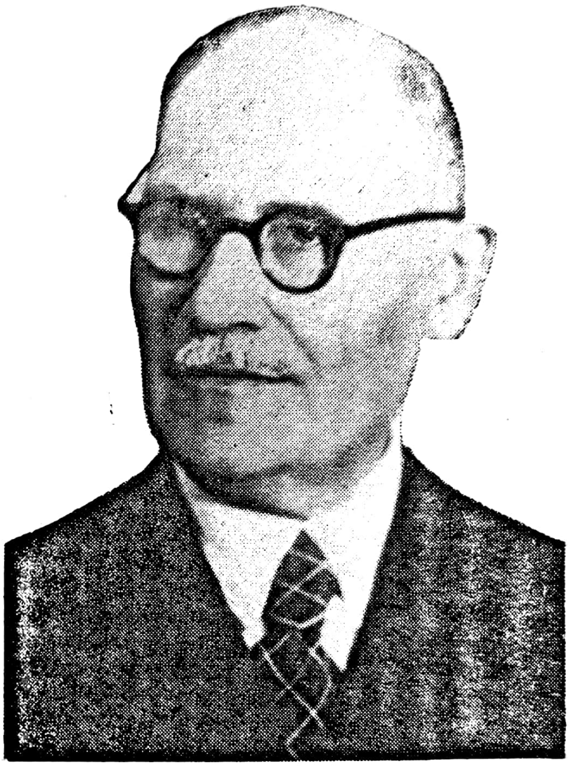


Fig. 11. — Dumitru Combiescu (1887 — 1961).

Acad. Dumitru Combiescu (1887—1961) a fost elevul prof. I. Cantacuzino încă din 1910, a rămas cunoscut aşa cum spunea P. L. Zdrodovski — ca „marele specialist în tifos exantematic". Începînd cu teza sa de doctorat „*Fixarea complementului în sifilis*" (1912), lucrările sale privind influenţa mediului de cultură asupra proprietăţilor antigenice ale germenilor microbieni, cercetările referitoare la anticorpii heterofili, studiile întreprinse asupra imunităţii cutanate sau a imunităţii locale în general, cercetările sale cu privire la mecanismul infecţiei cărbunoase (rolul pielii, receptivitatea pulmonară, vaccinarea anticărbunoasă şi imunitatea locală în antrax) etc. reprezintă numai unele din problemele de microbiologie generală şi medicină experimentală care l-au preocupat.

Apropiat de concepţia maestrului său, care nu a înţeles niciodată ruptura dintre studiile microbiologice şi legătura lor cu terenul, acad. D. Combiescu şi-a format încă de tînăr concepţia epidemiologică care trebuie totdeauna aplicată problemelor de microbiologie practică. Partea capitală a operei sale o constituie astfel studiul rickettsiozelor şi zoonozelor.

Preocupat permanent de problemele de imunitate, el a contribuit, prin lucrări valoroase, la cunoașterea mecanismelor de imunitate în holeră, *tifos* exantematic, infecții streptococice, difterie, antrax etc.

Spirit analitic, sobru și circumspect față de generalizări, prof. Ionescu-Mihăești nu îngăduia în gîndirea sa, în metodele sale de lucru, sau în stilul său de exprimare, nici un fel de compromis sau elemente insuficient controlate. El împărțea cu generozitate elevilor și colaboratorilor cunoștințele sale, întreținute permanent de o documentare științifică, critic selecționată, precum și întinsa sa experiență din domeniul atît de vast al științelor experimentale.

Pe de altă parte, ca o latură a puternicii sale sensibilități, îndreptate spre tot ce umanitatea a reușit să aducă mai frumos în patrimoniul artei și literaturii, acad. C. Ionescu-Mihăești rămîne în conștiința elevilor și colaboratorilor săi ca un estet desăvîrșit care — prin cunoștințele, observațiile și aprecierile sale, expuse cu un farmec rar întîlnit — a reușit să înnobileze prieteniile și să captiveze pe cei din jurul său.

Succesor al prof. Cantacuzino la Catedra de medicină experimentală mai întîi, și de bacteriologie ulterior, precum și la direcția Institutului „Dr. I. Cantacuzino", acad. C. Ionescu-Mihăești, în decurs de aproape trei decade, conducînd colective puternice, a format numeroși elevi, a căror justă orientare microbiologică și îndemînare este pusă, azi, în slujba construirii socialismului din țara noastră.

Fig. 11. — Dumitru Combiescu (1887 — 1961).

Acad. Dumitru Combiescu (1887—1961) a fost elevul prof. I. Cantacuzino încă din 1910, a rămas cunoscut așa cum spunea P. L. Zdrodovski — ca „marele specialist în tifos exantematic". Începînd cu teza sa de doctorat „*Fixarea complementului în sifilis*" (1912), lucrările sale privind influența mediului de cultură asupra proprietăților antigenice ale germenilor microbieni, cercetările referitoare la anticorpii heterofili, studiile întreprinse asupra imunității cutanate sau a imunității locale în general, cercetările sale cu privire la mecanismul infecției cărbunoase (rolul pielii, receptivitatea pulmonară, vaccinarea anticărbunoasă și imunitatea locală în antrax) etc. reprezintă numai unele din problemele de microbiologie generală și medicină experimentală care l-au preocupat.

Apropiat de concepția maestrului său, care nu a înțeles niciodată ruptura dintre studiile microbiologice și legătura lor cu terenul, acad. D. Combiescu și-a format încă de tînăr concepția epidemiologică care trebuie totdeauna aplicată problemelor de microbiologie practică. Partea capitală a operei sale o constituie astfel studiul rickettsiozelor și zoonozelor.

Eficiența catedrei de epidemiologie a fost mult ușurată cînd acad. D. Combiescu a primit însărcinarea de a o organiza și de a-i imprima conținutul și orientarea necesară. Astfel, cercetările sale clinice, epidemiologice și experimentale au contribuit substanțial și la organizarea în teren a luptei antiepidemice ce trebuia dusă în țara noastră.

Ocupîndu-se de febra butonoasă, el a urmărit reproducerea experimentală a leziunilor cutanate (,,șancrul de inoculare'') la șoareci, șobolani și cobai. În 1941 a obținut pneumonia rickettsiană la cîine, folosind plămînul infectat pentru producerea unui nou vaccin antiexantematic.

El a indentificat febra Q în țara noastră (1946—1947), ca și leptospirozele existente în R.P.R., determinîndu-le tipurile serologice.

Prof. Paul Riegler (1867—1936), elev al lui Victor Babeș, a creat școala de microbiologie veterinară din țara noastră. Ținînd permanent contactul cu ctitorii microbiologiei romînești — Victor Babeș și I. Cantacuzino — prof. P. Riegler s-a format la aceste școli, publicînd singur sau în colaborare o serie de note și memorii de o valoare științifică incontestabilă. Printre acestea ar trebui reamintite patogenitatea pentru pești a unor germeni din genul *Proteus*, toxicitatea *Act. mallei* și receptivitatea bovideelor la infecția morvoasă experimentală etc.

O preocupare importantă a prof. Riegler a fost, pe lîngă cea didactică, și înființarea și organizarea Institutului Pasteur, astăzi o mîndrie a țării noastre, unde se prepară serurile și vaccinurile de uz veterinar.

Cercetător pasionat, dotat cu o inteligență vie, dublată de o cultură remarcabilă, prof. André Boivin (1895—1949) francez de origine, a reușit, în scurta sa existență, să obțină o serie întreagă de realizări și date noi în domeniul biochimiei. Preocupîndu-se inițial, la Strassbourg, în special de cercetări microanalitice, este solicitat, în 1930, de prof. Cantacuzino să reorganizeze învățămîntul de Chimie medicală de la Facultatea de medicină din București. Ca profesor de chimie biologică al acestei facultăți, André Boivin rămîne în țara noastră 6 ani, timp în care conduce, în Institutul ,,Dr. I. Cantacuzino'', un laborator de chimie și fiziologie microbiană, orientîndu-și cercetările în domeniul chimiei bacteriene. După ce stabilește principiile care intră în compoziția bacteriilor, studiază ansamblul substanțelor azotate și fosforate acidosolubile ale acestora, descoperind antigenele glucido-lipidice, care aveau să-i dirijeze cercetările ulterioare către imunochimie. Descoperirile antigenelor glucido-lipidice și a identității lor cu endotoxinele au constituit o răscruce în imunologie, demonstrînd inexactitatea concepțiilor anterioare care susțineau în mod exclusiv constituția proteică a antigenelor.

Realizări importante a obținut și prin cercetările sale asupra rolului acizilor nucleici în constituția citologică a bacteriilor, asupra existenței nucleului bacterian, asupra rolului A.D.N. ca vector al caracterelor genetice etc. Ingeniozitatea cercetătorului era dublată de un talent pedagogic deosebit, care i-a permis să formeze, atît la București, cît și ulterior, la Paris și Strassbourg, echipe de cercetători pe care i-a animat permanent prin entuziasmul său neobosit.

Prof. Gh. Zotta (1886—1942), în afară de lucrări referitoare la hematologia comparată și studii asupra flagelatelor la insecte și plante, dintre care o specie de *Leptomonas* îi poartă numele, în afară de studiile sale asupra raselor de anofeli din zona balcanică și a Europei centrale, precum şi a anofelismului şi paludismului din deltele fluviilor (Delta Dunării), s-a preocupat, cu rara pasiune care îl caracteriza, de patogenia şi transmiterea tifosului exantematic, ca şi de metodele specifice de vaccinare.

Fig. 12. — Paul Riegler (1867 — 1936).

Fig. 13. — André Boivin (1895 — 1949).

Experienţele efectuate cu ocazia acestor studii, prof. Gh. Zotta, contractînd tifosul exantematic, le-a plătit cu preţul vieţii sale.

Dr. C. Gorescu (1879—1931), unul dintre primii colaboratori ai prof. I. Cantacuzino, a organizat, cu 50 de ani în urmă, primele laboratoare ale Ministerului Sănătăţii (Craiova, Constanţa), aducînd la îndeplinire în acest fel concepţia practică a marelui său dascăl.

Dr. Gh. Magheru (1892—1952), colaborator de seamă al Institutului „Dr. I. Cantacuzino", un om de înaltă cultură şi sensibilitate, a lucrat mai ales în etiologia şi patogenia tusei convulsive (lucrări experimentale), precum şi în problemele privind caracterele de patogenitate ale *Esch. coli* şi seroterapia anticolibacilară. Cercetările sale privitoare la obţinerea unui vaccin TAB eficient stau şi azi la baza preparării, în ţara noastră, a acestui produs biologic.

Dr. Ecaterina Radacovici (1892—1960) a fost una dintre cele mai apropiate colaboratoare ale

Fig. 14. — Gheorghe Zotta (1886 — 1942).

şi a anofelismului şi paludismului din deltele fluviilor (Delta Dunării), s-a preocupat, cu rara pasiune care îl caracteriza, de patogenia şi transmiterea tifosului exantematic, ca şi de metodele specifice de vaccinare.

Fig. 12. — Paul Riegler (1867 — 1936).

Fig. 13. — André Boivin (1895 — 1949).

Experienţele efectuate cu ocazia acestor studii, prof. Gh. Zotta, contractînd tifosul exantematic, le-a plătit cu preţul vieţii sale.

Dr. C. Gorescu (1879—1931), unul dintre primii colaboratori ai prof. I. Cantacuzino, a organizat, cu 50 de ani în urmă, primele laboratoare ale Ministerului Sănătăţii (Craiova, Constanţa), aducînd la îndeplinire în acest fel concepţia practică a marelui său dascăl.

Dr. Gh. Magheru (1892—1952), colaborator de seamă al Institutului „Dr. I. Cantacuzino", un om de înaltă cultură şi sensibilitate, a lucrat mai ales în etiologia şi patogenia tusei convulsive (lucrări experimentale), precum şi în problemele privind caracterele de patogenitate ale *Esch. coli* şi seroterapia anticolibacilară. Cercetările sale privitoare la obţinerea unui vaccin TAB eficient stau şi azi la baza preparării, în ţara noastră, a acestui produs biologic.

Dr. Ecaterina Radacovici (1892—1960) a fost una dintre cele mai apropiate colaboratoare ale

Fig. 14. — Gheorghe Zotta (1886 — 1942).

prof. Zotta şi ulterior, a acad. M. Ciucă. Lucrările sale privitoare la o serie de boli parazitare, şi mai cu seamă asupra epidemiologiei malariei, efectuate singură sau în colaborare, sînt bine cunoscute, atît în ţară, cît şi în străinătate.

Dr. Max Marbe (1874—1959), fost şef de secţie în Institutul „Dr. I. Cantacuzino", a avut o activitate îndelungată şi la Catedra de medicină experimentală a Facultăţii de medicină din Bucureşti. A lucrat în problema difteriei şi a imunologiei generale. Dotat cu un deosebit spirit organizatoric a contribuit într-o largă măsură la sistematizarea materialului de documentare în cadrul bibliotecii institutului.

Acad. M. Nasta.

Acad. M. Nasta (1890—1965), elev şi colaborator al prof. I. Cantacuzino, a lucrat în probleme variate de microbiologie, dar mai cu seamă în infecţia tuberculoasă experimentală şi clinică. Numeroasele sale lucrări (aproape 300) tratează aspecte numeroase ale biologiei *M. tuberculosis* (metabolism, antigene, caractere de patogenitate, aspecte ale imunogenităţii etc.), precum şi ale raporturilor care se stabilesc între bacil şi animalul sau omul bolnav de tuberculoză. În special lucrările privitoare la mecanismele imunităţii şi alergiei tuberculoase, cărora le scot în evidenţă particularităţile şi totodată capacitatea lor de încadrare la locul cuvenit în ansamblul legilor care prezidă procesele infecţioase şi ale imunităţii, sînt de o importanţă deosebită şi de o remarcabilă claritate.

Pe de altă parte, cercetările sale privitoare la metabolismul, virulenţa şi rezistenţa la tuberculostatice a *M. tuberculosis*, ca şi consecinţele terapeutice şi epidemiologice inerente, interpretate mai totdeauna sub aspectul lor inedit şi original, fac mereu obiectul numeroaselor rapoarte ale Congreselor internaţionale, ca şi al reuniunilor medicale din ţară. Concepţiile sale profilactice, curative şi organizatorice sînt permanent imprimate în gîndirea medicală a cadrelor noastre de specialitate, ceea ce favorizează şi completează în chip fericit, în ţara noastră, eficacitatea luptei antituberculoase.

În lupta antituberculoasă din patria noastră, în a cărei orientare şi azi se constată recomandările făcute la timpul său de către prof. I. Cantacuzino, acad. M. Nasta a creat şi a dezvoltat, pe linia unui tradiţionalism sănătos, îmbinat cu aspecte mereu noi ale acestei probleme, o operă de profilaxie specifică care, în cadrul condiţiilor optime din ţara noastră, oferă oamenilor muncii de la noi o susţinută acţiune de profilaxie şi combatere a acestei boli.

*

Dintre microbiologi, elevi ai lui Babeş, Cantacuzino şi Levaditi, care azi îşi continuă cu vigoare activitatea lor ştiinţifică de microbiologie emeriţi, sînt :

Acad. M. Ciucă (născut în 1883), elev şi colaborator apropiat al prof. I. Cantacuzino, are o activitate ştiinţifică şi organizatorică prodiprof. Zotta și ulterior, a acad. M. Ciucă. Lucrările sale privitoare la o serie de boli parazitare, și mai cu seamă asupra epidemiologiei malariei, efectuate singură sau în colaborare, sînt bine cunoscute, atît în țară, cît și în străinătate.

Dr. Max Marbe (1874—1959), fost șef de secție în Institutul „Dr. I. Cantacuzino", a avut o activitate îndelungată și la Catedra de medicină experimentală a Facultății de medicină din București. A lucrat în problema difteriei și a imunologiei generale. Dotat cu un deosebit spirit organizatoric a contribuit într-o largă măsură la sistematizarea materialului de documentare în cadrul bibliotecii institutului.

Acad. M. Nasta.

Acad. M. Nasta (1890—1965), elev și colaborator al prof. I. Cantacuzino, a lucrat în probleme variate de microbiologie, dar mai cu seamă în infecția tuberculoasă experimentală și clinică. Numeroasele sale lucrări (aproape 300) tratează aspecte numeroase ale biologiei *M. tuberculosis* (metabolism, antigene, caractere de patogenitate, aspecte ale imunogenității etc.), precum și ale raporturilor care se stabilesc între bacil și animalul sau omul bolnav de tuberculoză. În special lucrările privitoare la mecanismele imunității și alergiei tuberculoase, cărora le scot în evidență particularitățile și totodată capacitatea lor de încadrare la locul cuvenit în ansamblul legilor care prezidă procesele infecțioase și ale imunității, sînt de o importanță deosebită și de o remarcabilă claritate.

Pe de altă parte, cercetările sale privitoare la metabolismul, virulența și rezistența la tuberculostatice a *M. tuberculosis*, ca și consecințele terapeutice și epidemiologice inerente, interpretate mai totdeauna sub aspectul lor inedit și original, fac mereu obiectul numeroaselor rapoarte ale Congreselor internaționale, ca și al reuniunilor medicale din țară. Concepțiile sale profilactice, curative și organizatorice sînt permanent imprimate în gîndirea medicală a cadrelor noastre de specialitate, ceea ce favorizează și completează în chip fericit, în țara noastră, eficacitatea luptei antituberculoase.

În lupta antituberculoasă din patria noastră, în a cărei orientare și azi se constată recomandările făcute la timpul său de către prof. I. Cantacuzino, acad. M. Nasta a creat și a dezvoltat, pe linia unui tradiționalism sănătos, îmbinat cu aspecte mereu noi ale acestei probleme, o operă de profilaxie specifică care, în cadrul condițiilor optime din țara noastră, oferă oamenilor muncii de la noi o susținută acțiune de profilaxie și combatere a acestei boli.

*

Dintre microbiologi, elevi ai lui Babeș, Cantacuzino și Levaditi, care azi își continuă cu vigoare activitatea lor științifică de microbiologie emeriți, sînt:

Acad. M. Ciucă (născut în 1883), elev și colaborator apropiat al prof. I. Cantacuzino, are o activitate științifică și organizatorică prodigioasă. Urmărită în evoluția sa, activitatea științifică a acad. M. Ciucă constituie o punte de trecere între ceea ce reprezenta microbiologia medicală la începutul secolului nostru, pătrunsă de spiritul pasteurian, căruia de altfel i-a rămas pe deplin credincios, și porțile viitorului acestei științe, căreia, cercetîndu-i cu răbdare condițiile dezvoltării, îi adaugă necontenit fapte noi de observație, pe care le interpretează în lumina unor juste orientări științifice. Entuziasmului științific și rapidei adaptări la noile achiziții ale microbiologiei datorește acad. M. Ciucă orientarea modernă în microbiologia medicală, pe care o întregește cu noi și valoroase cercetări. În acord cu concepția lui Vinogradski, care depășește cu mult pe cea propovăduită altădată de marii microbiologi ai primelor decade ale secolului nostru, cînd se cereau numai culturilor pure de germeni, rupte de rapoartele lor ecologice, să explice fenomenele morbide, pentru acad. M. Ciucă, elevii și colaboratorii săi, cărora a avut grijă să le treacă la timp gîndirea sa asupra fenomenelor biologice, numai microbiologia ecologică este chemată să rezolve și să explice mecanismele variate ale fenomenelor morbide, ca și aspectele particulare biologice ale germenilor microbieni. Pentru acad. M. Ciucă, determinismul, care recunoaște existența „unui raport necesar și absolut între lucruri'', rămîne pivotul orientării și interpretării sale în microbiologie. Acest fapt îi acordă meritul, prea tîrziu observat și pus în evidență, că metoda sa de gîndire în biologie este dialectică, iar concepția sa în această știință a naturii este de cea mai pură esență materialistă. De asemenea, nu se poate să nu rămîi surprins de permanenta îmbogățire a gîndirii sale, care, pe măsura dezvoltării cercetărilor, te transportă pe nesimțite, de la reflexiile din domeniul biologic, în domeniul abstract al filozofiei, obligîndu-te să generalizezi fapte și idei.

Cercetările sale, efectuate cu colective puternice și variate, privesc numeroase probleme, printre care ar trebui reamintite paludismul și studiile referitoare la imunitatea acestei boli, bacteriofagul și fenomenele de bacteriofagie, unde împreună cu Bordet, descoperă, în 1921, pentru prima oară fenomenul de lizogenie, infecțiile streptococice și scarlatina, salmonelozele, difteria, rickettsiozele, infecțiile stafilococice și infecțiile de spital etc., pentru a nu înșirui decît numai unele din preocupările sale.

Pe de altă parte, diferitele valuri epidemice de durată, datorite diverselor calamități care s-au abătut în decursul ultimelor decade asupra țării noastre, l-au găsit pe acad. M. Ciucă în fruntea acțiunilor întreprinse împotriva lor, pe care de altfel le-a organizat. Organizator fără pereche, acad. M. Ciucă a continuat, în spiritul și eficiența sa, opera lui I. Cantacuzino, pe care puțini oameni de știință, cu cîteva decenii în urmă, au înțeles-o în însăși esența sa.

Planul de organizare a supravegherii active a eradicării malariei în țara noastră, din care părți esențiale sînt adoptate și de alte țări, precum și cunoașterii mecanismelor apariției, prevenirii și combaterii epidemiilor îl situează pe acad. M. Ciucă pe linia marilor dascăli însuflețiți de o dragoste nețărmurită pentru bolnavi și patria sa.

Prof. Al. Ciucă (născut în 1880), elev al lui I. Cantacuzino, a lucrat în special în probleme de microbiologie și patologie veterinară. Colaborator prețios al lui P. Riegler, cu care studiază toxicitatea bacilului morvos în infecția morvoasă experimentală a bovinelor, prof. Al. Ciucă folosește pentru prima oară (1929) fixarea de complement în determinarea tipurilor de virus aftos. Această lucrare, pe lîngă importanţa legată de febra aftoasă, s-a impus ca o metodă generală de lucru şi pentru studiul altor viroze. Folosită şi verificată de numeroşi microbiologi străini, reacţia de fixare a complementului în febra aftoasă este considerată azi ca una din reacţiile specifice, simple şi de execuţie rapidă pentru studii epizootologice şi imunologice specifice.

Cercetările sale în privinţa tratamentului durinei cu ajutorul neosalvarsanului la cabaline dezvăluie, pe de altă parte, şi preocupările sale în domeniul chimioterapiei la animale.

Prof. Al. Ciucă, fiind un cunoscător de seamă al proceselor imunologice la care sînt supuse animalele mari producătoare de ser hiperimun, a urmărit şi a condus, cu o competenţă desăvîrşită, mai bine de 40 de ani, producerea de seruri terapeutice de uz uman din Institutul ,,Dr. I. Cantacuzino''.

Organizator desăvîrşit, prof. Al. Ciucă a reuşit în toate marile acţiuni sanitar-veterinare pe care le-a iniţiat şi prin darul apropierii de oameni, pe care îl posedă într-un grad nemaiîntîlnit.

Acad. Ştefan S. Nicolau (născut în 1896) îşi începe instruirea şi cercetările sale în laboratorul prof. I. Cantacuzino şi le continuă în laboratorul de igienă şi bacteriologie al Facultăţii de medicină din Cluj. Aici, avînd ocazia să întîlnească pe marele nostru învăţat Constantin Levaditi, care era profesor de patologie generală şi experimentală, se ataşează la catedra sa, mai întîi ca asistent, şi apoi ca şef de lucrări. Plecat la Paris cu maestrul său, şi potrivit chemării lăuntrice pe care marii învăţaţi o au încă din tinereţea lor, acad. Ştefan S. Nicolau a continuat munca de cercetare ştiinţifică, concretizată în mai mult de 400 de memorii, comunicări şi note.

Cercetările asupra bolilor datorite ultravirusurilor, cum sînt cele privitoare la herpes, turbare, boala Borna, boala Carré, boala Aujeţki, poliomeilită, febră galbenă, febră aftoasă, hepatitele cu virus etc. au îngăduit, pe lîngă numeroase concluzii de ordin specific, şi unele concluzii de ordin general, ca : noţiunea de septinevrită, sindrom datorit propagării virusurilor neurotrope pe traiectul nervilor, admis azi de către toţi cercetătorii, neuroinfecţia sterilizată în cadrul imunităţii, variaţia posibilă a unor virusuri datorită adaptării la ţesuturi determinate şi a selectivităţii lor, variabilitatea virusurilor care se supun legilor generale de dezvoltare a materiei vii, au deschis noi orizonturi în problema atît de spinoasă şi uneori controversată a geneticii microorganismelor, explicarea morfogenetică a incluziilor celulare, fenomenul de paraimunitate etc.

Cercetările sale de chimioterapie, efectuate singur sau cu maestrul său Levaditi, cu aplicaţie în sifilisul experimental, spiriloze şi tripanozomiaze, au avut darul să arate, printre altele, şi mecanismul de acţiune a sărurilor de bismut în aceste afecţiuni.

Numeroasele studii asupra protozoarelor, dintre care unele au fost descoperite împreună cu Constantin Levaditi (de exemplu, *Encephalitozoon cuniculi*) precum şi asupra bolilor pe care acestea le provoacă (toxoplasmozele, leishmaniozele, tripanozomiazele etc.), arată încă o dată larga sferă de cercetare şi interes ştiinţific care au făcut parte din activitatea de abil cercetător a acad. Şt. S. Nicolau.

Lucrările acad. Ştefan S. Nicolau sînt cunoscute azi de toţi virologii eminenţi din toate colţurile lumii. Concepţiile şi orientarea dată celor mai multe din problemele pe care le-a abordat sînt azi comentate şi admise de majoritatea virologilor, întreţinîndu-se şi în felul acesta atenţia oamenilor de ştiinţă din lumea întreagă asupra valorii microbiologiei romîneşti.

Prof. Petre Condrea (n. 1888), elev şi colaborator al prof. Cantacuzino, în afară de o activitate didactică îndelungată, a avut realizări ştiinţifice deosebite, în special în problema tetanosului şi a tularemiei. Astfel, prof. Condrea a stabilit pentru prima dată raporturile dintre toxigeneza *Cl. tetani* şi caracterele morfologice ale germenilor, pe de o parte, şi morfologia coloniilor, pe de alta. Aceste cercetări au condus la îmbunătăţirea selecţionărilor tulpinilor de *Cl. tetani*, în vederea obţinerii de toxine active cu scopul preparării de anatoxine tetanice, puternic antigenice.

În problema tularemiei a obţinut rezultate deosebite, mai ales în studiul biologiei germenului cauzal, ca şi în diagnosticul şi tratamentul acestei boli, preparînd pentru prima dată la noi în ţară, tularina şi vaccinul antitularemic.

În afară de o serie de cercetări de imunologie generală, prof. Condrea a adus contribuţii importante şi la standardizarea metodei de titrare a serului antidizenteric.

Spirit analitic şi încrezător numai în observaţii care pot fi reproduse în experimente repetate, prof. Condrea a constituit totdeauna pentru elevii săi un exemplu de minuţiozitate şi deosebit simţ de răspundere în cercetarea ştiinţifică.

*

Instaurarea regimului democrat-popular în ţara noastră a înrîurit profund practica şi cercetarea în cadrul diferitelor ştiinţe ale naturii şi ştiinţelor sociale. Medicina, fiind totodată o înmănunchiere a unora din ştiinţele naturii cu ştiinţele sociale, este firesc ca practica şi cercetarea ştiinţifică medicală să fie înrîurite de baza şi suprastructura actualei noastre orînduiri sociale, care se influenţează reciproc. S-au semnalat numeroase prefaceri în practica medicală şi noi orientări în cercetare, ca o consecinţă a acestei linii de dezvoltare ştiinţifică. Prefacerile şi consecinţele lor fireşti au privit, mai întîi, esenţa doctrinei noastre medicale, la baza căreia stă azi profilaxia, care impune, pe lîngă multe alte realizări, şi îndepărtarea din gîndirea muncitorilor noştri sanitari a curativismului exclusiv. În al doilea rînd, întreaga asistenţă sanitară din ţara noastră fiind acordată gratuit, asigură măsuri unitare şi eficiente în toate sectoarele ei de manifestare, iar în al treilea rînd, munca în colectiv fiind mult mai rodnică, în opoziţie cu munca individuală, care nu este totdeauna eficientă şi competentă, s-a extins în mod deosebit. Această extindere a atras după sine o disciplină în muncă mai constantă şi o apreciere a ei mai dreaptă. Pe de altă parte, planificarea muncii ştiinţifice, legată de rezolvarea practică a unor probleme de sănătate publică, a înlesnit considerabil îmbunătăţirea muncii de cercetare, care înainte apărea, nu rareori, stearpă şi lipsită de creaţie. Numai în aceste condiţii puteau fi revalorificate opera şi recomandările marilor noştri înaintaşi.

Toate aceste prefaceri nu puteau avea loc fără acte revoluţionare. O nouă organizare a asistenţei noastre sanitare era indispensabilă; ea a fost, de altfel, în cîteva rînduri modificată şi îmbunătăţită, în raport cu noile condiţii obiective apărute între timp.

Înfiinţarea Inspecţiei sanitare de stat şi a reţelelor sanitare (1950), printre care reţeaua sanitară şi antiepidemică, cu centrele ei sanitare şi antiepidemice, asigură lărgirea cîmpului de acţiune al medicinei preventive. Această nouă reţea a contribuit substanţial la scăderea morbidităţii bolilor transmisibile, ca şi la educaţia sanitară a populaţiei.

Asigurarea unei baze materiale medicinei socialiste efectuate iniţial prin naţionalizarea spitalelor şi sanatoriilor particulare (1948), naţionalizarea farmaciilor şi laboratoarelor particulare (1949), care se adăugau la cele deja existente ale statului se face azi şi prin construirea masivă şi înzestrarea unui impresionant număr de unităţi sanitare noi, fabrici de medicamente şi antibiotice, lărgirea institutelor existente de cercetare medicală sau înfiinţarea altora noi etc.

Pe de altă parte, formarea de cadre noi şi meritorii, orientate mai ales către latura profilactică a medicinei, a fost posibilă prin reorganizarea învăţămîntului medical de toate gradele, precum şi prin înfiinţarea de noi facultăţi de medicină, şi în special a facultăţii de specializare şi perfecţionare a medicilor şi farmaciştilor, care a instruit, pentru nevoile medicale practice şi teoretice, un număr considerabil de medici specialişti.

Îmbunătăţirea continuă în anii regimului democrat-popular a condiţiilor materiale, asigurate prin dotarea institutelor de cercetări şi a celorlalte unităţi sanitare cu aparatură modernă, reactivi, precum şi lărgirea permanentă a posibilităţilor de documentare şi o orientare ideologică justă a muncii de cercetare ştiinţifică au creat, în domeniul microbiologiei, ca şi în acela al celorlalte discipline, condiţii optime de dezvoltare în ţara noastră.

Călăuziţi de materialismul dialectic microbiologii din R.P.R., luînd ceea ce este constructiv din trecutul microbiologiei mondiale şi romîneşti, îşi fundamentează azi cercetările lor ştiinţifice mai ales pe acele probleme de sănătate publică ale căror manifestări nu sînt încă deplin stăpînite. Valoarea acestor lucrări ştiinţifice de microbiologie, care au fost apreciate de nenumărate ori în diferitele congrese, simpozioane, colocvii şi conferinţe internaţionale, precum şi de reuniunile ştiinţifice din ţară noastră, ne îngăduie să considerăm că microbiologia din ţara noastră, afirmată viguros de înaintaşi şi dezvoltată competent de către contemporani, se va prezenta generaţiilor viitoare cu tendinţe mereu mai accentuate spre nivelul ridicat pe care poporul nostru muncitor nu numai că îl doreşte, dar are dreptul să-l şi pretindă.

Înființarea Inspecției sanitare de stat și a rețelelor sanitare (1950), printre care rețeaua sanitară și antiepidemică, cu centrele ei sanitare și antiepidemice, asigură lărgirea cîmpului de acțiune al medicinei preventive. Această nouă rețea a contribuit substanțial la scăderea morbidității bolilor transmisibile, ca și la educația sanitară a populației.

Asigurarea unei baze materiale medicinei socialiste efectuate inițial prin naționalizarea spitalelor și sanatoriilor particulare (1948), naționalizarea farmaciilor și laboratoarelor particulare (1949), care se adăugau la cele deja existente ale statului se face azi și prin construirea masivă și înzestrarea unui impresionant număr de unități sanitare noi, fabrici de medicamente și antibiotice, lărgirea institutelor existente de cercetare medicală sau înființarea altora noi etc.

Pe de altă parte, formarea de cadre noi și meritorii, orientate mai ales către latura profilactică a medicinei, a fost posibilă prin reorganizarea învățămîntului medical de toate gradele, precum și prin înființarea de noi facultăți de medicină, și în special a facultății de specializare și perfecționare a medicilor și farmaciștilor, care a instruit, pentru nevoile medicale practice și teoretice, un număr considerabil de medici specialiști.

Îmbunătățirea continuă în anii regimului democrat-popular a condițiilor materiale, asigurate prin dotarea institutelor de cercetări și a celorlalte unități sanitare cu aparatură modernă, reactivi, precum și lărgirea permanentă a posibilităților de documentare și o orientare ideologică justă a muncii de cercetare științifică au creat, în domeniul microbiologiei, ca și în acela al celorlalte discipline, condiții optime de dezvoltare în țara noastră.

Călăuziți de materialismul dialectic microbiologii din R.P.R., luînd ceea ce este constructiv din trecutul microbiologiei mondiale și romînești, își fundamentează azi cercetările lor științifice mai ales pe acele probleme de sănătate publică ale căror manifestări nu sînt încă deplin stăpînite. Valoarea acestor lucrări științifice de microbiologie, care au fost apreciate de nenumărate ori în diferitele congrese, simpozioane, colocvii și conferințe internaționale, precum și de reuniunile științifice din țară noastră, ne îngăduie să considerăm că microbiologia din țara noastră, afirmată viguros de înaintași și dezvoltată competent de către contemporani, se va prezenta generațiilor viitoare cu tendințe mereu mai accentuate spre nivelul ridicat pe care poporul nostru muncitor nu numai că îl dorește, dar are dreptul să-l și pretindă.

Morfologie bacteriană

Dr. A. Săsărman

Introducere. Deşi din antichitate s-a bănuit existenţa unor fiinţe microscopice, observarea şi descrierea primelor microorganisme au devenit posibile abia după descoperirea microscopului optic de către Leeuwenhoek, în anul 1683.

Cunoştinţele privind morfologia bacteriană au evoluat lent, o dată cu perfecţionarea microscopului şi a aparaturii tehnice şi, în general, cu dezvoltarea ştiinţelor naturii. Ele au căpătat un avînt deosebit abia după genialele descoperiri ale lui Pasteur, care a demonstrat etiologia microbiană a bolilor. Pe măsură ce descoperirea noilor agenţi cauzatori de boli s-a înmulţit, pe aceeaşi măsură au fost adîncite şi studiile privind structura acestor organisme, care părea simplă la prima examinare; ulterior s-a putut dovedi că structura bacteriilor este la fel de complexă, ca şi cea a celulelor organismelor superioare.

Un rol important în perfecţionarea cunoştinţelor de morfologie bacteriană l-au jucat progresele obţinute în domeniul citologiei generale, deşi acest lucru nu a fost suficient. Particularităţile structurale ale bacteriilor cereau tehnici proprii şi numai graţie acestora cunoştinţele de morfologie bacteriană au putut progresa rapid.

Un rol de seamă în adîncirea cunoştinţelor privind anatomia bacteriană l-au avut succesele din domeniul fiziologiei bacteriene. Numai cercetarea structurii anatomice a bacteriilor în legătura sa dialectică cu funcţia a permis să se obţină o interpretare justă a semnificaţiei diverselor formaţiuni morfologice observate la bacterii.

Generalităţi. Bacteriile, datorită marii lor dependenţe de condiţiile de mediu, prezintă o mare plasticitate sub influenţa diverşilor factori externi, ceea ce a făcut pe unii autori din trecut să nege oarecum existenţa unei forme stabile la bacterii. La această concepţie, care împiedică orice posibilitate de sistematizare în lumea bacteriilor, susţinătorii teoriei monomorfiste au răspuns cu o exagerare opusă, de pe o poziţie metafizică, antidarwinistă, care susţinea imuabilitatea formelor bacteriene. Dacă într-o anumită fază de dezvoltare a microbiologiei, teoria monomorfistă a jucat un rol în descrierea şi sistematizarea speciilor bacteriene, ea a devenit ulterior o piedică în interpretarea variaţiilor morfologice, care se observă în culturile bacteriene sub influenţa diverşilor factori de mediu, ca şi în explicarea mecanismului de apariţie a actualelor forme bacteriene. Dar în condiţii favorabile şi într-un timp istoric relativ scurt, forma şi dimensiunile majorităţilor bacteriilor variază în limite, care permit utilizarea criteriului morfologic în clasificarea lor, deşi din cauza marii lor simplicităţi morfologice, acest criteriu numai rareori poate servi pentru delimitarea familiilor şi genurilor. În unele cazuri, morfologia bacteriilor poate prezenta variaţii mari chiar în condiţii favorabile (pleomorfism) ceea ce reprezintă o trăsătură caracteristică pentru anumite bacterii (*Mycoplasma* spre exemplu).

Forma şi dimensiunile bacteriilor variază mult în funcţie de vîrsta culturii; elementele tinere şi în special acelea din faza logaritmică de creştere sînt mai omogene din acest punct de vedere, ceea ce face ca ele să fie considerate ca elemente morfologice, tipice.

Morfologia tipică este dată de aspectul pe care-l prezintă elementele active fiziologic în condiţii favorabile, adică aspectul pe care-l prezintă bacteriile în produsul patologic provenit de la un organism susceptibil, netratat cu antibiotice şi în absenţa bacteriofagilor specifici sau în culturi tinere, pe un mediu favorabil, la temperatura optimă, pentru specia respectivă.

Forma bacteriilor

La bacteriile tinere, în condiţii favorabile de mediu, se descriu următoarele trei forme fundamentale :

— forma rotundă (cocoidală), avînd cele 3 diametre apropiate ca dimensiuni ;

— forma alungită (bacilară), la care axul longitudinal predomină net asupra celor 2 diametre transversale ;

— forma încurbată, la care, pe lîngă predominenţa axului longitudinal asupra diametrelor transversale, se întîlneşte şi încurbarea axului longitudinal al celulei.

Se obişnuieşte să se individualizeze şi o formă intermediară între primele două tipuri morfologice, denumită formă cocobacilară, la care raportul dintre axul longitudinal şi diametrele transversale se apropie de 1.

Forma rotundă (cocoidală) poate prezenta pe lîngă tipul sferoidal propriu-zis, variante elipsoidale, ovoidale, lanceolate (pneumococ) sau chiar reniforme (gonococ). Cocii pot fi formaţi din una sau mai multe celule, ceea ce a fost pus în evidenţă mai recent prin tehnici speciale de colorare. Dispoziţia cocilor în frotiuri, în special în cele făcute din produsul patologic este uneori atît de caracteristică, încît permite identificarea unor specii patogene numai după acest aspect (gonococi etc.). Această dispoziţie caracteristică este datorită planurilor după care se face diviziunea celulară. În funcţie de acest lucru se descriu diplococi (coci dispuşi în perechi), în cazul cînd diviziunea se face după un singur plan (de exemplu, pneumococul etc.), tetrade (coci dispuşi cîte 4), cînd diviziunea se face după 2 planuri perpendiculare (de exemplu, tetragenul), sarcini (coci dispuşi în

„pachete” cubice), cînd există 3 planuri de diviziune perpendiculare (de exemplu, *Sarcina lutea* etc.) şi stafilococi (coci dispuşi în ciorchine), cînd diviziunea se face după numeroase planuri, dispuse neregulat (de exemplu, *Staphylococcus aureus* etc.). Atunci cînd, în urma diviziunii făcute după un singur plan, elementele rămîn legate între ele prin prelungiri fine ale pereţilor celulari, se obţin lanţuri de coci, aşa cum se prezintă streptococii.

Forma alungită (bacilară) poate prezenta, pe lîngă tipul cilindroid propriu-zis, variante fuziforme (*Fusobacterium fusiforme*) sau umflate la extremităţi (*C.diphtheriae*). Culturile unor specii de bacili pot prezenta pe lîngă elementele rectilinii şi elementele uşor încurbate, cum este cazul de pildă la *Mycobacterium tuberculosis*.

Capetele bacililor pot fi tăiate drept (*B. anthracis*), rotunjite (majoritatea bacililor) sau ascuţite. Asemănător cocilor, bacilii pot fi formaţi din una sau mai multe celule, ultima eventualitate fiind întîlnită în cazul bacililor Gram pozitivi.

Diviziunea bacililor se face transversal. În cazul cînd în urma diviziunii elementele rămîn legate între ele, se obţin fie perechi de bacili — diplobacili — fie bacili în lanţuri — streptobacili — (*H. ducreyi*).

Dispoziţia anumitor bacili în frotiuri este uneori destul de caracteristică, servind în unele cazuri, ca mijloc de diferenţiere între specii apropiate (bunăoară dispoziţia în „degete de mănuşă” a *C. diphtheriae*).

Forma cocobacilară, pe lîngă aspectul elipsoidal propriu-zis, poate prezenta, în cazul cînd elementele sînt mai subţiri la extremităţi, variante naviculare, cum ar fi bunăoară la *P. pestis*.

Formele încurbate pot prezenta curburi ale axului longitudinal, dispuse într-un singur plan (vibrionii) sau în mai multe planuri: în ultimul caz se obţin aspecte de spirală (spirilii şi spirochetele). Spirilii şi spirochetele sînt în general elemente relativ alungite şi posedă totdeauna capete rotunjite sau ascuţite.

Bacteriile pleomorfe (genul *Mycoplasma*) prezintă aspecte morfologice variate cum ar fi: corpusculi elementari filtrabili, pseudomicelii, bacili, filamente, corpi globuloşi.

În culturile vechi, ca şi sub influenţa unor agenţi fizici chimici sau biologici nefavorabili, apar forme aberante (filamentoase, umflate, ramificate etc.) mult diferite de aspectele tipice.

Formele „L” ale bacteriilor, care apar *in vivo* sau *in vitro* sub influenţa antibioticelor sau altor factori, prezintă elemente sferice de talii foarte variate, mergînd de la corpusculi elementari situaţi la limita puterii de rezoluţie a microscopului, pînă la corpi globuloşi enormi.

Dimensiunile bacteriilor

Dimensiunile bacteriilor sînt de ordinul micronilor, ceea ce face ca ele să nu poată fi observate decît cu ajutorul microscopului. Ca şi forma, dimensiunile variază mult în funcţie de vîrsta culturii şi de condiţiile de mediu, ceea ce face ca determinarea lor să se facă pe elementele tipice din culturile tinere şi în condiţii favorabile de mediu. Aceste dimensiuni se determină cu ajutorul ocularului micrometric, pe bacterii fixate şi colorate.

De aceea ele pot fi uneori subestimate, cînd se utilizează coloranţi care au o afinitate slabă pentru pereţii celulari.

La descrierea speciilor bacteriene se indică fie dimensiunile medii, fie mai frecvent, limitele în care variază dimensiunile majorităţii bacteriilor.

În cele ce urmează, vor fi date dimensiunile, corespunzînd formelor tipice ale celor mai importante bacterii patogene, grupate pe tipurile morfologice fundamentale.

a) Dimensiunile cocilor variază între 0,5 şi 2 μ, reprezentanţii cei mai importanţi ai acestui grup avînd următorul diametru :

Staphylococcus aureus 0,8—1 μ ; *Streptococcus pyogenes* 0,6 — 1 μ ; *Diplococcus pneumoniae* 0,5 — 1,25 μ ; *Neisseria meningitidis* 0,6 — 1 μ ; *Neisseria gonorrhoeae* 0,6 — 1 μ.

Bacilii prezintă dimensiuni variind între 0,3—2μ/0,5 — 10μ. Cei mai importanţi reprezentanţi ai acestui grup au următoarele dimensiuni : *Corynebacterium diphtheriae* 0,3 — 0,8μ/1 — 8μ, *Bacillus anthracis* 1 — 1,3μ/3 — 10μ, *Mycobacterium tuberculosis* 0,3 — 0,6μ/0,5 — 4μ, *Salmonella typhi* 0,6 — 0,7μ/2 — 3μ, *Clostridium tetani* 0,4 — 0,6μ/4 — 8μ, *Clostridium perfringens* 1 — 1,5μ/4 — 8μ.

Cocobacilii prezintă dimensiuni variind între 0,2 — 0,3μ/0,2 — 2μ, şi anume : *Bordetella pertussis* 0,2μ/0,3 — 1μ, *Pasteurella tularensis* 0,2μ/ /0,2 — 0,7μ, *Pasteurella pestis* 1μ/2μ.

Vibrionul holeric (*Vibrio comma*) are dimensiuni de 0,3 — 0,6μ/ 1 — 5μ.

Dintre reprezentanţii ultimului tip morfologic, *Borrelia recurrentis* are dimensiuni de 0,35 — 0,5μ/8 — 16μ, *Treponema pallidum* de 0,25 — 0,3μ/6 — 14μ şi *Leptospira icterohaemorrhagiae* de 0,25 — 0,3μ/6 — 9μ.

La bacteriile pleomorfe se întîlnesc corpusculi elementari de 0,125 — 0,25μ şi filamente avînd o lungime mare (de exemplu, la *Mycoplasma agalactiae* de 10 — 30μ).

Rickettsiile au dimensiuni de 0,6 — 1,2μ.

În culturile vechi, ca şi sub influenţa unor agenţi fizici, chimici sau biologici nefavorabili, dimensiunile bacteriilor pot creşte foarte mult, obţinîndu-se forme filamentoase cu o lungime de peste 100μ şi corpi globuloşi cu diametrul de 5 — 10μ.

Structura celulei bacteriene

Dificultăţile tehnice au împiedicat mult timp punerea în evidenţă a structurii reale a celulei bacteriene, ceea ce a dus la îndelungate controverse, unele din ele rezolvate abia în ultimul timp. În special, problema nucleului a suscitat cele mai numeroase discuţii şi în privinţa diviziunii lui mai există şi azi păreri contradictorii. Totuşi, în general, s-a dovedit că structura celulei bacteriene este asemănătoare cu cea a celulelor organismelor superioare, ea fiind alcătuită în linii mari dintr-un nucleu diferenţiat, citoplasmă şi perete celular. În comparaţie cu celulele organismelor superioare lipsesc : membrana nucleară (unii susţin existenţa ei), reticulul endoplasmic şi mitocondriile (mulţi susţin existenţa lor). Citoplasma bacteriilor este separată de peretele celular prin membrana citoplasmică. Unele bacterii mai pot prezenta o capsulă cu rol în virulenţă şi în specificitatea imunologică, cili, cu rol în mobilitate, spori, cu rol în rezistență. S-au mai descris formațiuni morfologice a căror semnificație este încă necunoscută, cum ar fi pseudocilii, fimbriile etc.

Nucleul bacterian

Pînă nu demult, problema existenței nucleului la bacterii a fost o chestiune foarte controversată, ipotezele mergînd de la negarea existenței oricărui sistem nuclear (Fischer, 1894), pînă la susținerea că celula bacteriană este constituită în întregime din nucleu. Dacă prima ipoteză reprezintă o reflectare a insucceselor în punerea în evidență a unui nucleu, similar cu ceea ce se observă la organismele superioare, cea din urmă, pornind de la aceleași insuccese, impune o interpretare diametral opusă acestui lucru, ținînd seama de marea afinitate a bacteriilor pentru culorile bazice de anilină. Astăzi se știe că această afinitate se datorește bogăției celulei bacteriene în acid ribonucleic (ARN), în mare cantitate în citoplasmă, care maschează acidul dezoxiribonucleic (ADN) nuclear.

Între cele două concepții diametral opuse arătate mai sus, se interpun o serie de alte ipoteze care susțin existența unui aparat nuclear diferențiat de citoplasmă, prezentat sub forme variate. Aceste ipoteze pot fi ușor împărțite în două grupe : 1) ipoteze care susțin existența unui nucleu difuz sau cromidial și 2) ipoteze care susțin existența unui nucleu diferențiat, unic sau în orice caz a unui număr redus de formațiuni nucleare, net distincte de citoplasmă.

Printre susținătorii teoriei nucleului difuz trebuie amintiți Zettnow, Pietschmann și Imșenețki. Pentru acești autori, nucleul s-ar prezenta sub formă de granule fin divizate și uniform dispersate în citoplasmă ; în anumite condiții, aceste granule s-ar putea regrupa pentru a-și asuma o formă definită, dar numai temporar.

Tot la această grupă aparține teoria nucleului cromidial, emisă și susținută de Schaudinn, Dobell, Guillermond, după care nucleul bacterian ar fi constituit din corpusculi de cromatină (cromidii), care la un moment dat s-ar grupa la cei doi poli, formînd doi corpusculi legați printr-o punte subțire.

Insuccesul la punerea în evidență a unor formațiuni nucleare asemănătoare celor existente în celulele organismelor superioare n-a împiedicat însă pe o serie de cercetători să-și continue lucrările în această direcție, care a dus pînă la urmă la elucidarea problemei nucleului la bacterii. Aceste lucrări, chiar dacă nu au reușit în toate cazurile să pună în evidență adevăratele formațiuni nucleare la bacterii, au menținut continuu interesul pentru cercetarea nucleului bacterian. Din punctul de vedere al rezultatului cercetărilor, lucrările din această grupă pot fi împărțite în două categorii : cele în care s-au descris formațiuni considerate de autorii respectivi ca nucleare, dar dovedite astăzi ca extranucleare și cele în care s-au descris formațiuni nucleare autentice.

Dintre lucrările din prima categorie trebuie să amintim cercetările soților Hollande, confirmate în țara noastră de V. Roșca, care a descris existența în celula bacteriană a unor formațiuni pe care le-a denumit nucleosom, paranucleosom și metanucleosom. Astăzi se știe că nucleosomul descris de Hollande nu reprezintă o formațiune nucleară, dar lucrările acestui autor au stimulat cercetările pentru punerea în evidență a unui nucleu individualizat, contribuind la combaterea teoriilor care negau existența nucleului la bacterii.

Printre primele cercetări care au reușit să pună în evidență formațiuni nucleare autentice, trebuie amintite cele ale lui Kitaev (1922), care, colorînd cu Giemsa germeni din grupul *Salmonella*, a observat și descris existența unor granule nucleare. O serie de alți cercetători sovietici au reușit să pună în evidență aparatul nuclear la diverse bacterii. Dintre aceștia trebuie citat în special Peșkov, care prin lucrările sale originale a demonstrat existența neîndoielnică a nucleului la bacterii.

O contribuție importantă la elucidarea problemei nucleului bacterian reprezintă de asemenea lucrările lui Badian (1930), Piekarski (1937) și Robinow (1942). Badian diferențiază frotiurile colorate cu Giemsa, cu ajutorul eozinei, iar Piekarski (1937) studiază nucleul cu o serie de metode în paralel : reacția Feulgen, colorația Giemsa, colorația cu acetocarmin, toate trei cu și fără hidroliză prealabilă cu HCl N/1, spectrofotometrie în U.V. și alte metode. Robinow a preluat și perfecționat tehnica colorării frotiurilor cu Giemsa după hidroliza acidă și cu ajutorul metodei fotografiilor în serie, a reușit să dea un tablou complet al structurii modificărilor fiziologice ale nucleului la bacterii.

Desigur că utilizarea termenului de nucleu bacterian trebuie făcută cu precizarea că avem de a face cu un nucleu diferind de nucleul celulelor organismelor superioare prin absența membranei nucleare a cromozomilor și a mitozei. Este vorba deci de un nucleu rudimentar, avînd funcțiile nucleare, dar diferind de un veritabil nucleu prin structură morfologică și mod de diviziune.

Nucleul se poate prezenta sub forme diferite, în funcție de specie microbiană, perioada de viață și factorii de mediu, putîndu-se găsi în preparate, fie un nucleu unic, fie subdivizat, din cauza diviziunii nucleare care precede diviziunea celulară, observîndu-se frecvent celule cu 2 și 4 nuclei (Scanga).

La bacteriile multicelulare se observă prezența a numeroși nuclei, proporțional cu numărul de celule.

O structură nucleară compactă se observă în culturile tinere active ; în faza staționară nucleul capătă un aspect vezicular și afinitatea electivă pentru coloranții nucleari diminuează încît uneori diferențierea de citoplasmă se face cu greu.

Punerea în evidență a nucleului bacterian se poate face cel mai fidel în preparate native la microscopul cu contrast de fază, suspendînd celulele în soluții concentrate de gelatină. Zona nucleară apare sub forma unei arii mai clare, situate în interiorul citoplasmei. Natura nucleară a acestei formațiuni este atestată de rezultatele obținute prin reacția Feulgen, specifică pentru nucleu, prin care s-au pus în evidență formațiuni similare cu cele observate în contrast de fază. Colorația nucleului se poate face și prin hidroliză acidă la cald, avînd rolul de a îndepărta ARN din citoplasmă, urmată de colorarea cu soluția Giemsa.

În general nucleul se poate prezenta fie sub aspectul unei formațiuni unice situate central, fie sub forma cîtorva formațiuni situate periferic. Un studiu sistematic, cu rezultate clar interpretabile s-a făcut doar în cazul primelor. În acest caz nucleul se prezintă sub forma unor bastonașe, haltere, literelor T, V, X, unor fluturi, dispuşi central şi transversal în cazul bacililor.

La microscopul electronic, corpusculii cromatinici apar în cazul celulelor tinere, ca arii clare în mijlocul citoplasmei opace, din cauza abundenţei acidului ribonucleic din citoplasmă.

În cazul cultivării bacteriilor pe medii lipsite de azot şi de fosfat, ele utilizează ARN propriu şi de aceea citoplasma apare mai clară decît nucleul. Deoarece microscopul electronic diferenţiază structurile numai în funcţie de densitatea lor, pentru confirmarea naturii nucleare a unei formaţiuni este neapărat necesar să se facă în paralel preparate colorate cu coloranţi specifici nucleari. Structurile nucleare au fost puse în evidenţă la microscopul electronic şi în secţiunile ultrafine prin bacterii, confirmîndu-se aspectele descrise prin celelalte metode. În secţiuni, zona nucleară apare umplută de fibriole de 20 — 50 Å, răsucite, formate din ADN. Prezenţa unui miez central necromatinic este un aspect excepţional, obţinut în condiţii patologice. La spori, nucleul are un aspect particular, în formă de inel, care se modifică în momentul germinării lor.

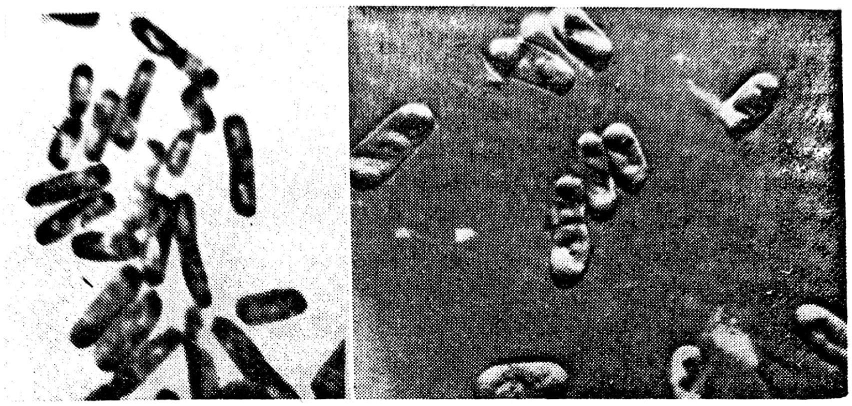


Fig. 15. — Punerea în evidenţă a nucleului la *Esch. coli* K 12, cu ajutorul microscopului electronic : în stînga, fără metalizare (zona clară) ; în dreapta, cu metalizare (zona înfundată), × 6500 (E. Kellenberger).

Iată care sînt după Robinow argumentele în favoarea naturii nucleare a formaţiunilor descrise mai sus :

— sînt prezenţi în celulele tinere care nu posedă incluzii (volutină, glicogen, lipide) cu care ar putea fi confundate ;

— pot fi puşi în evidenţă şi prin metode care nu implică un tratament cu HCl şi deci nu este vorba de artefacte după hidroliză ;

— prezenţa lor este constantă în toate celulele diferitelor specii, în orice stadiu al procesului de multiplicare ;

— diviziunea lor precede diviziunea celulară ;

— sînt Feulgen-pozitive ;

— prezintă o afinitate tinctorială strictă pentru coloranţii nucleari.

Dacă în privinţa existenţei nucleului la bacterii lucrurile par să fie clarificate, nu acelaşi lucru se poate spune despre mecanismul diviziunii acestuia.

Diviziunea nucleului, cel puţin pentru formaţiunile situate central, se face contrar părerilor anterioare, prin creştere de la un capăt şi nu prin scindare longitudinală. Mecanismul prin care se face această diviziune nu este clar, diferitele modele nesatisfăcînd decît în parte faptele cunoscute.

Astfel, cercetările din ultimele două decenii au reuşit să elucideze problema existenţei nucleului bacterian, dar mecanismul diviziunii acestuia rămîne încă o chestiune deschisă.

Citoplasma bacteriană

Ca şi în cazul altor celule, citoplasma bacteriană reprezintă sediul celor mai importante procese metabolice, al căror rezultat sînt creşterea şi multiplicarea celulei. Citoplasma bacteriilor constituie un sistem coloidal format din proteine, nucleo-proteine (ARN), enzime, lipide, pigmenţi, hidraţi de carbon, săruri minerale şi apă (despre constituţia chimică a citoplasmei se va vorbi la capitolul Fiziologie bacteriană), avînd densitatea 1 055 (Leontiev, 1927) şi un punct izoelectric care variază în jurul unui pH de 3,0 — 4,0.

Citoplasma celulelor tinere este intens bazofilă, datorită bogăţiei în ARN; această bazofilie scade cu vîrsta.

Vîscozitatea citoplasmei oscilează în limite largi, fiind mai redusă la celulele tinere active, decît la cele în stare de repaus (Gostev, 1951).

Aspectul citoplasmei depinde de vîrstă şi condiţiile de dezvoltare a celulei bacteriene. În celula în faza iniţială a creşterii şi în condiţii normale de dezvoltare, citoplasma apare ca o masă omogenă, compactă, care aderă de membrana citoplasmică şi prin aceasta de peretele celular.

În celulele care se găsesc într-o fază mai avansată de creştere sau care sînt supuse acţiunii unor factori nefavorabili citoplasma îşi pierde treptat densitatea şi prezintă retracţiuni centripete, care o îndepărtează de pereţi; în acelaşi timp, citoplasma ia un aspect granular, cu arii clare şi mai opace, iar într-o fază mai avansată, în celula goală apar corpusculii sferici izolaţi.

În citoplasma bacteriilor au fost descrise (Bradfield) următoarele formaţii structurale:

a) granule mici de 100 — 200 Å, conţinînd succindehidrogenază, citocromi, enzimele ciclului Krebs şi majoritatea ARN;

b) aşa-numitele granulaţii de volutină (corpusculii Babeş-Ernst în cazul *C. diphtheriae* etc.), care se colorează metacromatic, conţin metafosfat, sînt foarte opace pentru electroni şi variază în dimensiuni de la cîteva sute Å la 0,5μ;

c) granulaţii şi vacuole diverse, conţinînd: sulf, glicogen, ARN şi lipide, incluzînd acid poli-β-hidroxibutiric.

În comparaţie cu celulele organismelor superioare, din celula bacteriană lipseşte reticulul endoplasmic, iar problema existenţei mitocondriilor este încă controversată.

Vacuolele reprezintă formaţii, conţinînd diferite substanţe în soluţii apoase, înconjurate de obicei de o membrană numită tonoplast, avînd o constituţie similară cu cea a membranei citoplasmice (Scanga). La microscopul optic, vacuolele apar ca formaţii rotunde, mai puţin refringente decît restul citoplasmei. La microscopul electronic, vacuolele apar ca formaţii mai clare decît citoplasma. Diametrul vacuolelor este de 0,3 — 0,5 μ. Ele apar în celulă în timpul creşterii rapide şi dispar în culturile vechi.

Mecanismul formării vacuolelor ar fi următorul (Knaysi, 1951): în faza de creştere activă, în celulă intră mai multă apă decît este necesar; excesul se separă sub formă de picături, în care se dizolvă produsele de metabolism hidrosolubile, iar lipidele şi proteinele se acumulează în jurul picăturii, dînd naştere tonoplastului. Un argument în favoarea acestei explicaţii este faptul că introducînd celulele într-o soluţie hipertonică, vacuolele dispar.

Incluziunile reprezintă formaţiuni constituite din particule solide, care se găsesc în protoplasmă inconstant şi numai la anumite specii, reprezentînd probabil substanţe de rezervă (Scanga). Spre deosebire de vacuole, ele apar în celule numai după terminarea perioadei de creştere activă. Incluziunile sînt constituite din substanţe puţin sau de loc solubile.

Incluziunile cele mai importante, întîlnite în citoplasma bacteriilor sînt: granulaţiile de volutină, glicogen, amidon, lipide, sulf şi carbonat de calciu.

Granulaţiile de volutină au fost descrise iniţial de Babeş şi Ernst sub numele de corpusculi metacromatici, deoarece se colorează în roşu cu soluţiile vechi de albastru de metilen, care conţin azur. Ele sînt foarte abundente la *Spirillum volutans* de unde li se şi trage numele. Ele sînt de asemenea numeroase la germenii din genul *Corynebacterium* şi sînt rare la bacteriile gram-negative.

Compoziţia mediului (prezenţa fosfaţilor etc.) influenţează formarea acestor granulaţii.

La microscopul electronic, granulele de volutină apar ca nişte corpusculi denşi, net delimitaţi, care se volatilizează în urma unui bombardament electronic intens.

După unii autori, granulaţiile de volutină ar fi constituite din acizi nucleici, dar aceştia se colorează ortocromatic. Alţii susţin că ar fi vorba de un complex de acid ribonucleic-metafosfat. Bogăţia în ARN ar explica bazofilia intensă a granulaţiilor de volutină, precum şi rezistenţa mărită la decolorare în raport cu restul citoplasmei. Ele se colorează vital cu roşu neutru $1^{0}/_{00}$ sau cu albastru de metilen foarte diluat şi se dizolvă prin fierbere (Scanga).

Granulaţiile de volutină nu iau parte la diviziunea bacteriilor.

Granulaţiile de glicogen şi amidon reprezintă rezerve nutritive. Sînt prezente în special la familia *Bacillaceae*. Se prezintă sub forma de mase adesea refringente. Cu iod, granulele de glicogen se colorează în galbene-brune, iar cele de amidon în albastru.

Granulaţiile lipidice apar ca nişte corpusculi rotunjiţi foarte refringenţi. Nu se colorează cu coloranţii obişnuiţi de anilină, apărînd ca arii clare în interiorul bacilului colorat. Se colorează cu coloranţii grăsimilor (Sudan III, spre pildă). Ele sînt înconjurate de o membrană asemănătoare tonoplastelor. Se găsesc la multe specii, mai ales aerobe. Granulaţiile lipidice reprezintă rezerve nutritive.

Granulaţiile de sulf se găsesc la sulfobacterii, fiind constituite din sulf în stare coloidală.

Mitocondriile

Existenţa mitocondriilor la bacterii formează pentru specialişti o chestiune controversată. Ele au fost puse în evidenţă pentru prima dată de către Mudd, la genul *Mycobacterium*.

La microscopul electronic apar ca formaţii opace, sferoidale sau elipsoidale, de dimensiuni variind între 0,02 şi 0,7µ înconjurate de o membrană limitantă. Sînt situate în apropierea centrului sau polilor bacteriilor, fiind mai dense decît formaţiile nucleare. În urma unui bombardament electronic intens se pot volatiliza, ca şi granulaţiile de volutină. În urma lizei fagice, mitocondriile rămîn intacte, spre deosebire de formaţiile nucleare.

Mitocondriile conţin sistemele enzimatice de oxidoreducere, ceea ce poate fi pus în evidenţă prin reducerea intravitală a sărurilor de tetrazoliu. De asemenea, ele sînt bogate în fosfolipide. În mitocondrii s-a putut pune în evidenţă prezenţa succinoxidazei, dehidrogenazei şi adenozintrifosfatazei.

Privitor la natura acestor formaţii s-au emis următoarele ipoteze: mitocondriile descrise ar fi ori nuclei, ori corioizi, adică formaţii mixte cu funcţii de nuclei şi mitocondrii, ori, în fine, artefacte. Susţinătorii naturii mitocondriale a formaţiilor observate demonstrează, cu această ocazie, diferenţele între nuclei şi mitocondrii.

Din cele arătate se vede că problema nu este încă complet elucidată, fiind necesare noi cercetări pentru a clarifica chestiunea existenţei mitocondriilor.

Membrana citoplasmică

Citoplasma este limitată la exterior de un strat subţire, însă mai condensat şi mai intens colorabil, care o separă de peretele celular, denumit membrană citoplasmică. Din cauza dificultăţilor legate de punerea în evidenţă şi de separarea acestei membrane de protoplasmă, unii autori au negat existenţa ei, susţinînd că ar fi vorba de o acumulare de colorant la suprafaţa citoplasmei. Knaysi (1951), bazîndu-se pe faptul că protoplasma este mai sensibilă la autoliză decît membrana citoplasmică, s-a servit de acest procedeu pentru a elimina pe prima, demonstrînd net existenţa celei din urmă.

În cazul fenomenului de plasmoliză, membrana citoplasmică urmează retracţia citoplasmei, îndepărtîndu-se de peretele celular rigid, ceea ce indică legătura strînsă dintre primele două formaţii celulare. Nu este însă clar, dacă între citoplasmă şi membrana citoplasmică există o simplă adeziune sau sînt legături mai intime.

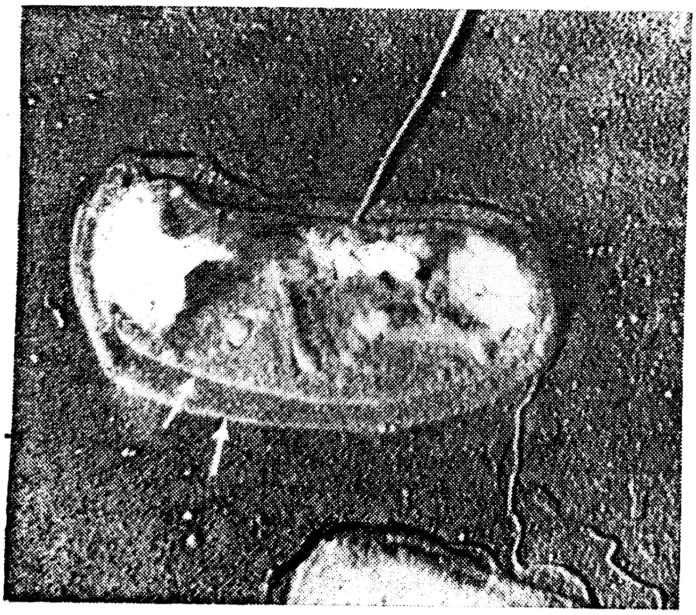


Fig. 16. — *Vibrio cholerae Inaba* în autoliză avansată. Se observă peretele celular şi membrana citoplasmică, × 40 000 (Scanga).

Membrana citoplasmică are o grosime de 50 — 100 Å, fiind de natură lipoproteică. Ea reprezintă o membrană semipermeabilă, formînd bariera

La microscopul electronic apar ca formaţii opace, sferoidale sau elipsoidale, de dimensiuni variind între 0,02 şi 0,7μ înconjurate de o membrană limitantă. Sînt situate în apropierea centrului sau polilor bacteriilor, fiind mai dense decît formaţiile nucleare. În urma unui bombardament electronic intens se pot volatiliza, ca şi granulaţiile de volutină. În urma lizei fagice, mitocondriile rămîn intacte, spre deosebire de formaţiile nucleare.

Mitocondriile conţin sistemele enzimatice de oxidoreducere, ceea ce poate fi pus în evidenţă prin reducerea intravitală a sărurilor de tetrazoliu. De asemenea, ele sînt bogate în fosfolipide. În mitocondrii s-a putut pune în evidenţă prezenţa succinoxidazei, dehidrogenazei şi adenozintrifosfatazei.

Privitor la natura acestor formaţii s-au emis următoarele ipoteze: mitocondriile descrise ar fi ori nuclei, ori corioizi, adică formaţii mixte cu funcţii de nuclei şi mitocondrii, ori, în fine, artefacte. Susţinătorii naturii mitocondriale a formaţiilor observate demonstrează, cu această ocazie, diferenţele între nuclei şi mitocondrii.

Din cele arătate se vede că problema nu este încă complet elucidată, fiind necesare noi cercetări pentru a clarifica chestiunea existenţei mitocondriilor.

Membrana citoplasmică

Citoplasma este limitată la exterior de un strat subţire, însă mai condensat şi mai intens colorabil, care o separă de peretele celular, denumit membrană citoplasmică. Din cauza dificultăţilor legate de punerea în evidenţă şi de separarea acestei membrane de protoplasmă, unii autori au negat existenţa ei, susţinînd că ar fi vorba de o acumulare de colorant la suprafaţa citoplasmei. Knaysi (1951), bazîndu-se pe faptul că protoplasma este mai sensibilă la autoliză decît membrana citoplasmică, s-a servit de acest procedeu pentru a elimina pe prima, demonstrînd net existenţa celei din urmă.

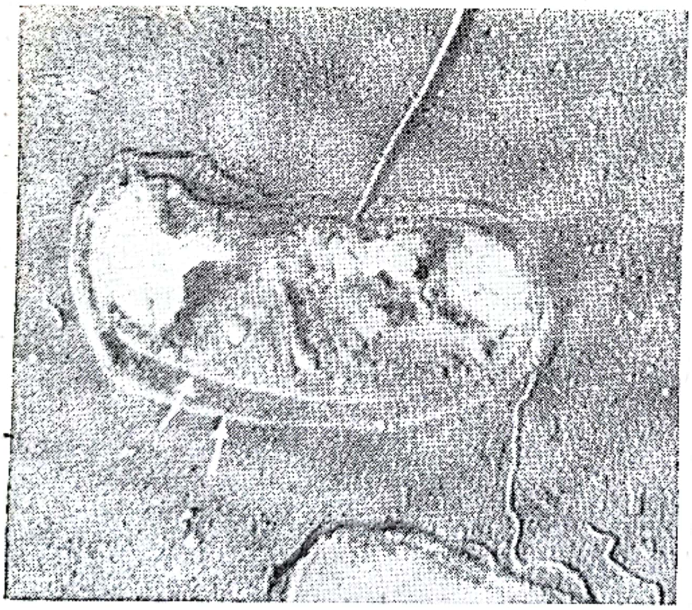


Fig. 16. — *Vibrio cholerae Inaba* în autoliză avansată. Se observă peretele celular şi membrana citoplasmică, × 40 000 (Scanga).

În cazul fenomenului de plasmoliză, membrana citoplasmică urmează retracţia citoplasmei, îndepărtîndu-se de peretele celular rigid, ceea ce indică legătura strînsă dintre primele două formaţii celulare. Nu este însă clar, dacă între citoplasmă şi membrana citoplasmică există o simplă adeziune sau sînt legături mai intime.

Membrana citoplasmică are o grosime de 50 — 100 Å, fiind de natură lipoproteică. Ea reprezintă o membrană semipermeabilă, formînd bariera osmotică a celulei. De asemenea, în cazul bacteriilor multicelulare, elementele pot fi separate uneori numai printr-un sept format de membrana citoplasmică.

Membrana citoplasmică are şi funcţii metabolice şi, după unii autori, ar lua parte la sinteza peretelui celular şi a capsulei.

Peretele celular

La exterior, învelind membrana citoplasmică, celula bacteriană prezintă o membrană rigidă, cu rol în menţinerea integrităţii celulare, denumită perete celular.

Grosimea redusă a peretelui celular, variind între 100—300 Å, precum şi afinitatea sa slabă pentru coloranţi, au făcut dificilă punerea lui în evidenţă, ceea ce a reuşit abia în urma experienţelor de plasmoliză : prin menţinerea bacteriilor în soluţii hipertonice, se obţine retracţia citoplasmei şi îndepărtarea ei de perete, care devine astfel vizibil.

Punerea în evidenţă a peretelui celular nu se poate face prin coloraţiile obişnuite, ci numai prin tehnici speciale, care utilizează fie coloranţi cu afinitate pentru componentele parietale (albastru Alcian), fie o mordansare prealabilă. În preparatele fixate cu acid osmic, peretele se colorează cu albastru Alcian şi verde Janus, fără o mordansare prealabilă ; dar majoritatea metodelor de colorare a peretelui celular folosesc mordanţi, cum ar fi, acidul tanic, urmat de colorarea cu coloranţi de anilină etc.

La microscopul electronic, peretele celular poate fi pus în evidenţă fie pe secţiuni ultrafine, fie pe celule plasmolizate sau autolizate. Pereţii bacteriilor Gram pozitive apar omogeni în imaginile electronooptice, în timp ce pereţii bacteriilor Gram negative prezintă două straturi. La unele bacterii, s-a pus în evidenţă o structură macromoleculară, vizibilă la microscopul electronic. Aceasta este reprezentată la Spirillum de sfere cu diametrul de 120—140 Å, dispuse hexagonal în unul din straturile parietale.

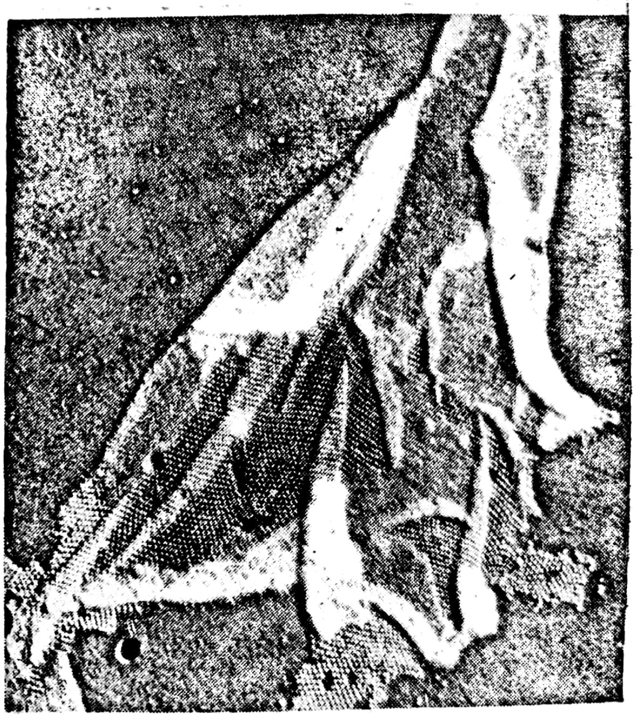


Fig. 17. — Structura ultramicroscopică a peretelui celular. Se observă stratul extern format din particule cu diametrul 120—140 Å şi stratul intern lipsit de structură, × 100 000 (A. L. Howink).

Una din proprietăţile esenţiale ale peretelui celular, care permite să-şi exercite funcţia protectoare asupra conţinutului celular este rigiditatea sa. În cursul plasmolizei, peretele nu urmează retracţia citoplasmei, menținîndu-și forma inițială, ceea ce demonstrează rigiditatea sa. Faptul că în urma fisurării pereților prin ultrasunete, ducînd la eliminarea conținutului citoplasmic la exterior, pereții celulari păstrează forma inițială a bacteriei, reprezintă un alt argument în favoarea rigidității acestora. Acești pereți, goliți de conținut, avînd contururile bacteriilor și colorîndu-se slab cu diverși coloranți, poartă numele de fantome. Un ultim argument în favoarea rigidității pereților este constituit de aspectul fisurilor provocate de ultrasunete: ele sînt asemănătoare liniilor de fractură pe care le prezintă corpurile rigide prin rupere.

Tenacitatea pereților celulari este deosebită la cocii Gram pozitivi, care rezistă la ultrasunete, congelării și decongelării succesive (cu excepția penumococului) etc.

Cu toată rigiditatea sa, peretele posedă un grad oarecare de elasticitate, care a fost pus în evidență prin experiențele de microdisecție.

Peretele celular este alcătuit dintr-o serie de componente majore, după cum urmează: componenta responsabilă de rigiditatea peretelui (mucocomplex), comună tuturor bacteriilor, cu excepția formelor L, acizii teichoici, întîlniți la bacteriile Gram pozitive și antigenul somatic (endotoxina) bacteriilor Gram negative, avînd un rol atît de important în virulența și structura antigenică a germenilor.

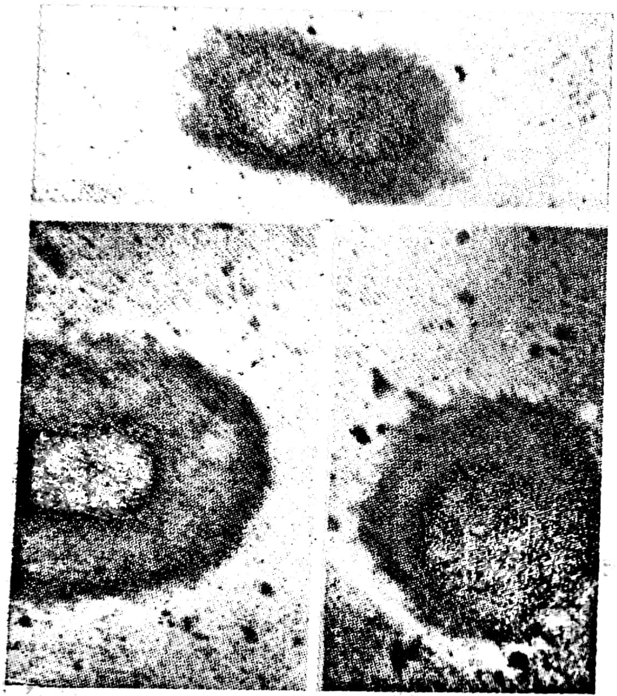


Fig. 18. — Fenomenul de umflare a capsulei văzut la microscopul electronic, × 10 500 (S. Mud și colab.).

Mucocomplexul parietal, sau glucopeptidul parietal omolog, formează rețeaua fundamentală a pereților tuturor bacteriilor, condiționînd rigiditatea acestora. El este constituit din glucozamină, acid muramic (polimer de glucozamină), acid diamino-pimelic, înlocuit de lizină în stafilococi, alanină, acid glutamic și alți 2—3 aminoacizi, adesea în formă D.

La bacteriile Gram pozitive, peretele este constituit în mod omogen de această rețea impregnată în funcție de specie, de alți constituenți cum ar fi, acidul teichoic, poliozide, polipeptide, proteine.

La bacteriile Gram negative, rețeaua glucopeptidică, reprezentînd abia 20% din totalitatea peretelui, intră în constituția stratului parietal profund, fiind mai laxă decît în cazul bacteriilor Gram pozitive, ca urmare a intricării moleculelor de lipide.

Acidul teichoic, a doua componentă parietală majoră, este un polimer de ribitol-5-fosfat, fiind întîlnit la unele specii Gram pozitive.

În sfîrșit, antigenul somatic (endotoxina) al bacteriilor Gram negative, reprezintă un complex glucido-lipido-polipeptidic, care formează stratul superficial al pereţilor acestor bacterii. Astfel structura pereţilor bacteriilor Gram-negative pare să fie următoarea (Colobert şi Greach, *1961)* :

Glucid antigenic
|
Lipid A superficial — Polipeptid superficial
| |
Lipid profund Glucopeptid profund

Analiza constituţiei chimice a pereţilor bacterieni a arătat că aceştia conţin glucide, lipide, proteine, dar în proporţii şi compoziţii diferite de restul celulei. S-a constatat că pereţii tuturor bacteriilor conţin glucide aminate : glucozamina şi acidul muramic sînt universal prezente, în timp ce chondrozamina, galactozamina, fucozamina se întîlnesc mai rar. Acidul muramic posedă o grupare carboxil, prin care se leagă de peptid şi o grupare reducătoare pentru legătura glicozidică cu glucidele. În pereţii bacteriilor Gram negative se găseşte acidul sialic, înrudit cu acidul muramic. Aceste aminozaharuri se găsesc sub forma unor compuşi N-acetilaţi.

Glucidele neaminate se întîlnesc la toate bacteriile Gram negative, intrînd în constituţia antigenului somatic, căruia îi determină specificitatea. În general găsim hexoze : glucoză, galactoză, manoză ; pentoze : xiloza, arabinoza ; metil-pentoze : rhamnoza şi fucoza.

Se presupune că ar exista şi heptoze (*E. coli*) şi acid uronic. Recent s-au pus în evidenţă la Salmonella : abequoza, paratoza, colitoza, tiveloza şi ascariloza (didesoxialdohexoze). Nu s-au întîlnit riboza şi dezoxiriboza şi nici alţi constituenţi ai acizilor nucleici.

În pereţii bacteriilor Gram pozitive se întîlnesc glucoza şi galactoza. Rhamnoza este caracteristică pentru streptococi, iar arabinoza pentru micobacterii şi corinebacterii. Polizaharidul *C. diphtheriae* conţine D-galactoză, D-manoză şi D-arabinoză. Pereţii celulari de la stafilococi nu conţin glucide neaminate.

În privinţa lipidelor, se constată absenţa lor totală în pereţii bacteriilor Gram pozitive, în timp ce pereţii bacteriilor Gram negative conţin 10—22% lipide, avînd rolul de a cimenta mozaicul moleculelor proteice. Endotoxina conţine doi constituenţi lipidici : lipidul B, uşor de detaşat şi lipidul A, strîns legat de restul complexului.

Pereţii bacterieni conţin o serie de aminoacizi, cu rol esenţial în formarea structurii parietale fundamentale. Astfel, alanina şi acidul glutamic se găsesc în toţi pereţii. Acidul diamino-pimelic (DAP), constituent exclusiv bacterian, este întîlnit în majoritatea pereţilor, cu excepţia celor de stafilococ, unde este înlocuit de lizină şi a formelor L stabile.

Mutantele DAP de *E. coli* sînt incapabile să sintetizeze un perete rigid în lipsa aminoacidului respectiv, ceea ce pare să indice existenţa unor relaţii între prezenţa DAP şi rigiditatea pereţilor bacterieni. Totuşi, după cum s-a văzut mai sus, există germeni care în ciuda lipsei DAP, posedă un perete rigid (cocii Gram pozitivi).

Din pereţii bacteriilor Gram pozitive lipsesc aminoacizii aromatici, cei sulfuraţi etc., fiind întîlniţi mai frecvent doar 3—4 aminoacizi. În pereţii bacteriilor Gram negative pot fi întîlniţi toţi aminoacizii, dar la o specie dată sînt prezenţi doar 3—4 aminoacizi.

Pentru izolarea pereţilor bacterieni de restul citoplasmei, s-au utilizat diferite metode, rezultînd superioritatea procedeelor mecanice, care nu afectează structura parietală. Este vorba în primul rînd de desintegrarea mecanică a celulei bacteriene, cu ajutorul unor perle fine de sticlă, într-un agitator cu o frecvenţă de 5 000 vibraţii pe minut. Ultrasunetele pot fi utilizate şi ele pentru dezintegrarea majorităţii bacteriilor, cu excepţia cocilor Gram pozitivi. În acest caz, dezintegrarea este consecinţa unui fenomen de cavitaţie. În sfîrşit, congelările şi decongelările succesive au fost recomandate pentru desintegrarea pneumococului.

Dintre procedeele enzimatice utilizate la obţinerea pereţilor celulari izolaţi, rezultatele cele mai bune s-au constatat în urma folosirii tripsinei la digestia citoplasmei, bacteriile fiind încălzite în prealabil la 75°C.

Procedeele chimice, cum ar fi tratarea cu alcalii s-au dovedit brutale, neconservînd intactă structura parietală.

Obţinerea de pereţi bacterieni izolaţi a permis să se determine structura lor morfologică, constituţia chimică şi volumul lor raportat la celulă, rezultînd o pondere a pereţilor de aproximativ 20—30% din greutatea uscată a bacteriilor.

Pereţii bacteriilor sînt sensibili la acţiunea unor enzime prezente la microorganisme şi organismele superioare. Astfel, lizozimul, prezent în diferite umori şi ţesuturi animale, hidrolizează mucocomplexul parietal prin acţiunea sa N-acetil-glucozaminazică, ducînd la liza bacteriilor Gram pozitive. La bacteriile Gram negative, mucocomplexul fiind situat profund, nu este accesibil acţiunii lizozimului decît în urma utilizării unor procedee speciale, cum ar fi tratarea celulelor cu EDTA.

Dacă îndepărtarea enzimatică a peretelui prin lizozim se face în medii protectoare hipertonice, conţinînd substanţe neionizabile (zaharoză, polietilenglicol), se obţin formaţiuni sferice, înconjurate doar de membrana citoplasmică, denumite protoplaşti.

O enzimă similară lizozimului a fost izolată din bacteriofagi, permiţînd acestora pătrunderea în celulă prin hidroliza mucocomplexului la nivelul respectiv.

Enzime cu acţiune asupra peretelui bacterian au mai fost descrise la *Bacillaceae* în cursul germinării sporilor, la pneumococi în cursul autolizei, la *Streptomyces* etc.

Pereţii bacterieni sînt sensibili şi la acţiunea unor substanţe chimice de tipul detergenţilor cationici.

Detergenţii anionici sînt rar toxici şi numai pentru bacteriile Gram pozitive, iar detergenţii neionici nu au acţiune bactericidă.

Structura pereţilor celulari este răspunzătoare de comportarea bacteriilor faţă de coloraţia Gram. Într-adevăr, lezarea integrităţii pereţilor bacteriilor Gram pozitive, sau îndepărtarea lor, duce la pierderea caracterului Gram pozitiv. Se ştie, că în general, bacteriile Gram pozitive sînt mai puţin sensibile faţă de acţiunea enzimelor proteolitice, alcaliilor, azidelor, teluritului, agenţilor oxidanţi, alexinei în prezenţa anticorpilor specifici. Ele sînt mai sensibile la acizi, detergenţi, solvenţi organici, iod. Bacteriile Gram pozitive ar conţine polimeri de fosfaţi organici nenucleici (acid poliglicerofosforic şi poliribitol fosforic) numiţi pozitine, care ar răspunde de caracterul Gram pozitiv. Ipoteza prezenţei ribonucleatului de magneziu, căruia i s-ar datori caracterul Gram-pozitiv, este greu de susţinut în urma demonstrării absenţei totale de acizi nucleici la nivelul pereţilor bacterieni.

Biosinteza peretelui se face prin polimerizarea complexului format de acid N-acetil muramic-peptid. Penicilina împiedică această polimerizare, ducînd la formarea de celule lipsite de componenta parietală rigidă, avînd drept consecinţă liza celulelor. Atunci cînd celulele bacteriene sînt supuse acţiunii penicilinei într-un mediu de cultură protector hipertonic, se obţin formaţiuni sferice, lipsite de un perete rigid, denumite sferoplaşti. Desigur că, ţinînd cont de mecanismul de acţiune al penicilinei, ea va avea influenţă numai asupra unor celule care se multiplică activ. De asemenea penicilina acţionează numai asupra bacteriilor, care conţin un perete rigid şi de aceea sînt fără acţiune asupra formelor „L'' şi asupra genului *Mycoplasma*, ceea ce se utilizează pentru selecţia acestora.

Sub influenţa penicilinei se constată acumularea unor precursori ai componentelor parietale, cum ar fi uridin-difosfat-amino-glucid-peptidul, care intră în compoziţia glucopeptidului parietal omolog şi citidin difosfat ribitolul, care intră în compoziţia acidului teichoic.

Se pare că bacitracina, oxamicina şi cristal violetul au o acţiune similară asupra pereţilor bacterieni.

Nu se cunoaşte locul de sinteză a peretelui. Se ştie doar că pereţii transversali cresc centripet în grosimea septului transversal, format de membrana citoplasmică.

Rolul pereţilor celulari este în primul rînd de a proteja bacteria, ferind-o de acţiunea factorilor mecanici : bacteriile lipsite de perete celular sînt foarte fragile.

Peretele bacterian mai are rolul de a contracara presiunea osmotică ridicată din interiorul celulei (15—20 atmosfere) ; în lipsa peretelui, bacteriile se lizează în mediile obişnuite, care au o presiune osmotică mult inferioară celei de mai sus.

Peretele celular este răspunzător şi de menţinerea formei bacteriene : în lipsa peretelui rigid, bacteriile capătă într-un mediu protector adecvat, o formă sferică.

Rigiditatea şi contracararea mecanică a presiunii interne par să fie datorite unor componente diferite, căci formele L, spre deosebire de protoplaşti, mai posedă o structură parietală capabilă să contracareze presiunea osmotică internă, deşi nu mai posedă un perete rigid.

Peretele celular are un rol esenţial în fixarea fagilor pe celula bacteriană. În lipsa peretelui, fagul nu se poate fixa pe celula bacteriană, deşi multiplicarea lui în celulă are loc, dacă îndepărtarea peretelui celular s-a făcut după adsorbţia fagului.

Peretele celular reprezintă în acelaşi timp sediul unor antigene importante cum ar fi antigenul somatic (endotoxina) al bacteriilor Gram negative şi substanţa specifică de grup a streptococilor.

Peretele bacterian mai are rol în diviziunea celulară, căci protoplaştii, lipsiţi de perete celular, nu se multiplică.

Nu s-a putut pune în evidenţă vreo funcţie metabolică a peretelui celular şi nici vreun rol în permeabilitatea selectivă a învelişurilor celulare, funcţie care revine în întregime membranei citoplasmice. Totuşi, prin prezenţa grupărilor ionizabile, peretele ar putea avea un rol în fixarea şi absorbţia unor substanţe, în special la bacteriile Gram negative, care posedă un perete mult mai complex.

Capsula şi stratul mucos

Capsula şi stratul mucos fac parte dintre formaţiunile celulare superficiale extraparietale, caracterizate prin faptul că pot fi îndepărtate, fără a se afecta viabilitatea celulei bacteriene. Aceste formaţiuni, evidenţiabile citologic sau imunologic numai la unele bacterii, se prezintă sub forma unui înveliş, mai mult sau mai puţin voluminos, continuu sau discontinuu, cu, dar mai ales fără structură, alcătuit dintr-o masă vîscoasă, gelatinoasă, avînd o compoziţie chimică variată şi a cărui producere este dependentă de specie sau tulpină şi de condiţiile de mediu.

În funcţie de posibilităţile de punere în evidenţă a acestor structuri, deosebim pe de o parte formaţiuni evidenţiabile atît citologic, cît şi imunologic şi pe de altă parte formaţiuni evidenţiabile doar imunologic. Structurile din prima categorie se pot prezenta sub două aspecte morfologice distincte : o formă bine dezvoltată, net delimitată, uşor de evidenţiat citologic şi mai stabilă în soluţii apoase, denumită capsulă şi o formă rău delimitată, mai greu de evidenţiat şi care se solubilizează rapid în soluţii apoase, denumită strat mucos.

În categoria structurilor evidenţiabile doar imunologic se pot distinge de asemenea două tipuri de formaţiuni deosebite : prima, reprezentată de antigenele de suprafaţă, în afara celor capsulare, constituind „microcapsula", evidenţiabilă imunologic şi stabilă şi a doua constituită de componentele extracelulare vîscoase, care se spală uşor de pe suprafaţa bacteriei.

Dintre structurile superficiale extraparietale enumerate, vor fi discutate doar primele două, deoarece includerea în acest capitol a antigenului Vi reprezintă încă o problemă controversată, iar ultima nu prezintă importanţă din punct de vedere morfologic.

Prezenţa capsulei şi stratului mucos a fost semnalată la numeroase specii bacteriene. Capsula a fost descrisă la pneumococi, streptococi (grup A şi C), *B. anthracis*, *B.megaterium*, *B.circulans*, *Cl. perfringens*, *H.influenzae*, *Klebsiella*, *E.coli* etc., iar stratul mucos a fost descris la *Str.salivarius*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus bifidus*, *B. subtilis*, *B.polymyxa*, *Brucella* etc. Unele bacterii pot prezenta, în funcţie de condiţiile de cultivare, fie capsulă, fie strat mucos.

Capsula se prezintă sub forma unui înveliş, care îmbracă bacteria pe toată suprafaţa ei sau excepţional numai în anumite porţiuni, ultima reprezentînd tipul de capsulă discontinuă. La germenii dispuşi în perechi sau lanţuri, capsula îmbracă într-un manşon continuu întregul grup de elemente.

În general capsulele nu prezintă o structură morfologică internă şi sînt lipsite de o membrană limitantă la exterior. Totuşi, la unele tulpini de *B.megaterium* s-a pus în evidenţă o structură particulară a capsulei, constînd dintr-o reţea de natură polizaharidică, care cuprinde în ochiurile sale o substanţă de natură polipeptidică. De asemenea la unele tulpini de *E. coli* s-au pus în evidenţă, în interiorul capsulei, structuri fibrilare striate, dispuse perpendicular pe peretele celular.

Dimensiunile capsulei și ale stratului mucos pot varia de la 20μ, cît reprezintă grosimea învelișului mucos la *Brucella*, pînă la cîțiva microni. Alteori, mediul întreg poate fi transformat într-o masă gelatinoasă.

Indicele de refracție al substanței capsulare este apropiat de cel al mediului, ceea ce face capsula greu vizibilă în stare nativă la microscopul obișnuit. De asemenea capsula nu se colorează cu coloranții obișnuiți, apărînd în frotiuri ca un halo incolor, care înconjoară bacteria. De aceea, punerea ei în evidență se realizează cel mai bine printr-o metodă de colorație negativă, la care mediul și bacteria apar colorate, în contrast cu capsula necolorată (metoda Burri cu tuș de China).

În general, colorarea capsulei se poate face numai dacă se efectuează o mordansare prealabilă a preparatului, utilizîndu-se ca mordanți mai ales sărurile de cupru. Unii coloranți speciali, ca albastru Alcian, colorează capsula și fără o mordansare prealabilă, colorantul respectiv avînd afinitate pentru structurile de natură polizaharidică, ceea ce face să fie folosit și la colorarea electivă a peretelui celular. De asemenea albastrul Loeffler și albastrul Manson, pot colora uneori metacromatic capsula *B. anthracis*.

Pentru punerea în evidență a capsulei s-a mai propus adăugarea de ser, colorarea făcîndu-se la un pH situat între punctul izoelectric al proteinei și al substanței capsulare. Folosind aceeași metodă, dar fără colorare, numai prin ajustarea corespunzătoare a pH-ului amestecului de germeni și ser, capsula poate fi pusă în evidență în stare nativă la microscopul cu contrast de fază.

Un efect similar prezintă și adăugarea la germenii capsulați a unui ser specific : contururile capsulei se văd net, ea apărînd mărită ca volum, de unde denumirea fenomenului de „umflare a capsulei" (fenomenul Neufeld). De fapt, umflarea reală a capsulei nu are loc decît dacă la sistemul de mai sus se adaugă și alexină, în celelalte cazuri fiind vorba de o mărire aparentă de volum, datorită punerii în evidență prin această metodă a contururilor reale ale capsulei (Tomcsik și colab.).

La microscopul electronic capsula apare ca un halo slab vizibil în jurul bacteriei opace, din cauza densității reduse electrono-optice pe care o prezintă.

Substanța capsulară poate fi obținută prin extracție în apă caldă, sau în soluții ușor alcaline sau acide. Consistența ei vîscoasă este datorită constituției sale macromoleculare și asimetriei moleculei.

Studiul chimic al substanțelor capsulare și al celor constituind stratul mucos, a arătat că ele pot fi grupate în hidrați de carbon, proteine și acizi nucleici.

Glucidele au fost izolate din capsulele de pneumococi, streptococi, *B. circulans*, *B.megaterium* (rețeaua capsulară), *Klebsiella*, *E. coli* etc. La *H.influenzae* capsula este constituită din poliribofosfat.

Polipeptide capsulare au fost descrise la *B. anthracis*, *B.megaterium* (în ochiurile rețelei polizaharidice), *B. subtilis*. La *P. pestis* s-a descris o capsulă constituită în parte dintr-un complex proteină — polizaharid.

Capsule, formate din ADN s-au descris mai ales la bacteriile halofile, deși ele pot fi întîlnite și la alți germeni.

Prin hidroliza substanțelor capsulare izolate, s-au putut pune în evidență elementele lor constitutive. Astfel, polizaharidul capsular al pneumococului de tip III este un polimer de acid celobiuronic. Acidul hialuronic, care reprezintă substanţa capsulară la streptococi este un polimer de N-acetil-glucosamină şi acid glucuronic. Polizaharidul produs de *L.mesenteroides* (dextran) este un polimer de glucoză. Polipeptidul din capsula *B.anthracis* (γ-glutamil peptid) este un polimer de acid D-glutamic.

În general substanţele capsulare diferă ca constituţie chimică de restul componentelor celulare, dar au fost semnalate excepţii de la această regulă, cum ar fi polizaharidul reţelei capsulare de la *B.megaterium* „M", identic cu cel parietal şi cazul ADN.

O serie de enzime produse de germeni diverşi sau izolate din ţesuturile animale sînt capabile să scindeze substanţele capsulare. Astfel, unele enzime izolate din microorganisme scindează polizaharidul pneumococic de tip III, altele polizaharidul pneumococic de tip VIII şi există enzime microbiene care scindează γ-glutamil peptidul. S-a observat de asemenea că lizatele fagice de *Klebsiella* degradează polizaharidul capsular al aceluiaşi germene.

Uneori germenii înşişi produc enzime, care atacă capsula proprie. Astfel, streptococii produc hialuronidaza, care scindează capsula de acid hialuronic, formată în primele ore de cultivare, iar pneumococii produc enzime autolitice, care degradează polizaharidul capsular.

S-a constatat că enzime extrase din hematii, rinichi, ficat şi alte ţesuturi animale scindează γ-glutamil peptidul din capsula unor *Bacillaceae*.

Substanţele capsulare diferă din punct de vedere antigenic de restul componentelor celulare, reprezentînd fie antigene complete, fie haptene. Astfel, glutamil-polipeptidul izolat din capsula *B.anthracis* nu stimulează producerea de anticorpi, dar inocularea *B. anthracis* la iepuri, dă naştere la anticorpi care reacţionează specific cu polipeptidul respectiv. De asemenea, polizaharidul capsular pneumococic se comportă ca o haptenă în cazul inoculării la iepure, dar în inocularea la om şi şoarece se comportă ca un antigen complet.

În unele cazuri, cum ar fi la pneumococi, *Klebsiella* etc., substanţa capsulară diferă la diverse tipuri, reprezentînd unica deosebire ce poate fi pusă în evidenţă între ele. La pneumococ s-au diferenţiat pe baza antigenului capsular, peste 70 tipuri. Diferenţierea acestor tipuri se face cu ajutorul serurilor specifice, utilizînd reacţia de „umflare" a capsulei.

Tipul pneumococului poate fi modificat prin cultivarea în prezenţa ADN extras dintr-o tulpină de tip diferit (fenomenul de „transformare").

Producerea de capsulă este un caracter potenţial constant la unele specii bacteriene. Ea se poate realiza numai în anumite condiţii de mediu. La unele bacterii (pneumococ, *B.anthracis*), capsula se formează numai în organismul animal, sau pe medii speciale (adăugarea de proteine native, etc.), iar la *Str. salivarius* producerea de dextran are loc doar în prezenţa zaharozei. La *B. megaterium* producerea polipeptidului capsular nu are loc pe medii sintetice, avînd ca singure surse de carbon şi azot, glucoza şi nitraţii, cînd se produce doar polizaharidul capsular, identic cu cel parietal. La bacteriile halofile, acumularea ADN în jurul celulei este favorizată de cultivarea pe medii cu concentraţii suboptimale de sare, iar o concentraţie suficientă de calciu previne această acumulare.

Uneori capsula apare sub influenţa unor factori nefavorabili (fag etc.).

Bacteriile capsulate pot da naştere frecvent la variante necapsulate, pierderea acestei structuri fiind asociată adesea şi cu modificarea altor caractere.

În privinţa mecanismului de formare a capsulei, se pare că ea este secretată de membrana citoplasmică, iar uneori ea este produsă la exteriorul celulei.

Capsula are un rol important în virulenţă, împiedicînd fagocitarea germenilor. Variantele necapsulare ale bacteriilor patogene capsulate sînt avirulente. De asemenea, capsula măreşte rezistenţa germenilor la uscare.

Faptul că învelişul capsular poate fi îndepărtat pe cale enzimatică, fără a se afecta viabilitatea celulei, arată că stratul mucos sau capsula nu constituie o componentă indispensabilă a celulei, funcţia sa reducîndu-se la aceea de a oferi bacteriei un înveliş protector faţă de fagocitoză şi alţi factori nocivi.

Cilii

Deşi citaţi la urmă printre anexele celulei bacteriene, cilii, filamente neramificate, sinuoase, ataşate cu un capăt de celula bacteriană, nu au un rol de neglijat. Astăzi este aproape unanim admis că mobilitatea bacteriilor este datorită mişcării cililor, deşi viabilitatea bacteriilor nu este afectată de îndepărtarea lor. Unii autori neagă rolul cililor în mobilitate (Pijper), susţinînd că ar fi vorba de artefacte produse în urma mişcării şi fixării preparatului. Într-adevăr au fost descrise salmonele imobile, care posedau totuşi cili, dar aceşti cili nu erau animaţi de mişcări, ceea ce atestă, dimpotrivă, legătura dintre mobilitatea cililor şi a bacteriilor.

Din cauza diametrului lor redus, cilii nu pot fi văzuţi la microscopul optic în preparatele colorate prin metode obişnuite, ci numai în urma utilizării unor tehnici speciale sau folosind microscopul electronic. Cilii se inserează pe o granulaţie bazală aflată în interiorul citoplasmei, trecînd prin peretele celular, care prezintă orificii la acest nivel.

Priviţi din orice parte, cilii apar sinuoşi, ceea ce arată că forma lor este de helicoid cilindric, părere care nu este acceptată de unii autori (Pijper).

Pe de altă parte, Pijper susţine că celulele bacteriene în mişcare prezintă o coadă dreaptă, care devine sinuoasă, cînd mişcarea încetează. Pare însă probabil că coada dreaptă reprezintă o iluzie optică, din cauza vitezei mari de mişcare a cililor.

Helicoidul flagelar prezintă un sens de răsucire trigonometric (contrar acelor unui ceasornic), avînd o lungime de undă şi amplitudine constantă la o anumită tulpină bacteriană.

La aceeaşi tulpină pot exista cili care au lungimi de undă diferite, în raport 1/2. Uneori chiar acelaşi cil poate avea lungimi de undă diferite în segmente diferite.

S-au descris de asemenea cili încolăciţi, cu amplitudinea foarte mare şi lungimea de undă foarte mică, astfel că după uscare stau cu axul longitudinal perpendicular pe lamă, apărînd ca nişte cercuri.

Cilii sînt filamente cu diametrul uniform, care nu se subţiază. Grosimea filamentului variază cu specia, fiind de pildă la *Proteus vulgaris* de 12 mμ. Ei sînt foarte fragili, rupîndu-se prin agitare.

Unii autori descriu la cili existenţa unui filament central înconjurat de o teacă. În unele cazuri, filamentul central era compus din 2—3 fibrile răsucite.

Numărul şi dispoziţia cililor variază la diferitele grupe de bacterii, fiind destul de caracteristice uneori, în special în privinţa dispoziţiei, ceea ce a făcut să se utilizeze mult în trecut acest ultim criteriu în taxonomie. Din cauza nenumăratelor abateri de la dispoziţia caracteristică a cililor în anumite grupe bacteriene, astăzi se acordă mai puţină importanţă acestui criteriu de clasificare. În funcţie de prezenţa, numărul şi dispoziţia cililor se descriu bacterii monotriche, cu un singur cil polar, amfitriche, posedînd cili la ambele capete, lofotriche, avînd un mănunchi de cili la un capăt sau cîte un mănunchi la cele două capete şi, în fine, peritriche, cu cili dispuşi pe toată suprafaţa celulei.

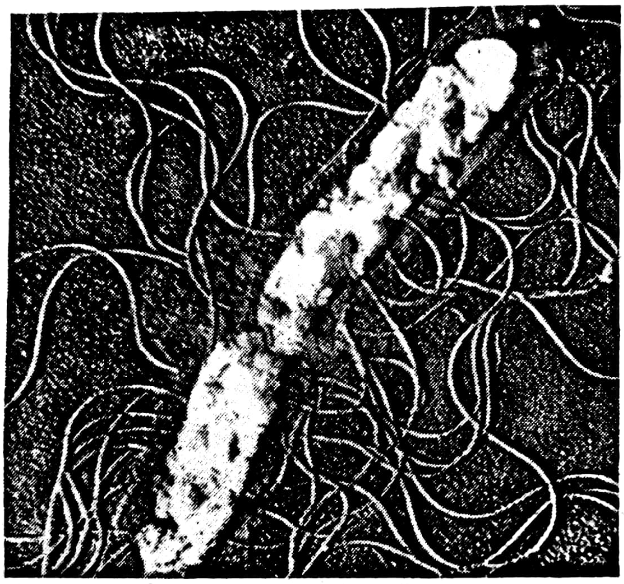


Fig. 19. — *Cl. tetani*, tulpina Stockholm, celulă autolizată parţial; permite observarea inserţiei citoplasmice a cililor, × 24 000 (Scanga).

Compoziţia chimică a cilindrilor diferă de cea a corpilor bacterieni. O suspensie stabilă de cili se comportă similar cu o soluţie de proteină cu molecule lungi.

Prin fierbere sau la un pH sub 4,0 cilii se dezintegrează ireversibil. Substanţa care rezultă din dezintegrarea cililor la un pH coborît este o proteină cu o compoziţie caracteristică în aminoacizi, pentru care s-a propus denumirea de flagelină. Flagelina intră în aceeaşi clasă cu keratina, miozina, epidermina şi fibrinogenul. Ea poate prezenta două configuraţii, α, laxă şi β, supercontractată. Mişcarea s-ar datori schimbării ritmice a lanţului polipeptidic de la o configuraţie la alta.

Din punct de vedere imunologic, cilii reprezintă un antigen diferit de cel somatic, numit antigen „H". Se cunoaşte un număr foarte mare de antigene flagelare, care au fost bine studiate în special la genul *Salmonella*. Aglutinarea salmonelelor la pH 4,0 este datorită aglutinării cililor.

Formarea cililor este influenţată de condiţiile de mediu. Astfel, o temperatură ridicată sau prezenţa fenolului, duc la apariţia de celule aciliate.

În privinţa mecanismului de mişcare a cililor nu se ştie dacă energia de mişcare a cililor este transmisă de la granulaţia bazală sau ia naştere la nivelul cilului. Deşi în urma îndepărtării pereţilor celulari prin lizozim, cilii rămîn ataşaţi de protoplaştii formaţi, totuşi aceştia sînt imobili. De asemenea, cilii rămîn ataşaţi de celulele autolizate, observîndu-se în acest caz la microscopul electronic granulaţiile bazale pe care se inserează, care sînt mai rezistente la autoliză, decît restul citoplasmei.

Granula bazală a cilului ar emite semnale care determină contracţia ritmică a lanţului polipeptidic din care este constituit cilul; tot ea ar fi sursa de energie necesară mişcării şi ar lua parte la sinteza cililor, care sînt împinşi printr-o perforaţie a peretelui rigid celular. Sinteza cililor are loc foarte rapid.

Activitatea cililor este răspunzătoare şi de fenomenul mobilităţii coloniilor bacteriene, factorii care inhibează mişcarea cililor împiedicînd şi mobilitatea coloniilor.

Fimbriile

Cilii nu sînt unicele formaţii filamentoase pe care le posedă bacteriile. Astfel, s-a observat că bacteriile crescute în contact cu suprafeţele solide posedă prelungiri fine filamentoase, mult mai scurte decît cilii şi avînd doar ondulaţii uşoare, denumite fimbrii. Ele au fost descrise la *Pseudomonas*, *Klebsiella* etc.

Fimbriile se deosebesc de cili prin rezistenţa la pH scăzut şi prin constituţia antigenică diferită.

Ele permit fixarea bacteriilor pe suprafeţele solide avînd un rol în hemaglutinare.

Nu există nici o legătură între prezenţa fimbriilor şi mobilitatea celulelor bacteriene.

Endosporii

Anumite bacterii pot da naştere la un moment dat unor formaţii greu colorabile şi refringente, care poartă denumirea de endospori. Aceştia apar în interiorul celulelor respective, care se dezintegrează după maturarea sporilor. Caracteristica principală a sporului este rezistenţa marcată la agenţii externi: pe cînd majoritatea formelor vegetative sînt omorîte în cîteva minute la 65—70°, mulţi spori rezistă chiar la fierberea prelungită, iar unii rezistă peste 3 ore la 115° (Curran). Rezistenţa este marcată şi faţă de dezinfectanţi: unii spori rezistă pînă la 24 de ore în apă oxigenată 4 %, o oră în HCl 10 % şi peste o săptămînă în fenol 5 % (Curran).

Rezistenţa sporilor variază cu specia, vîrsta, temperatura şi mediul în care s-a făcut sporularea etc. O serie de substanţe ca acizii graşi, ionii de Ca şi Mg etc. măresc rezistenţa sporilor.

Sporii îşi menţin viabilitatea timp îndelungat: s-au găsit spori vii în probe închise ermetic, după 115 ani de conservare (Curran).

Menţinerea îndelungată a viabilităţii sporilor se explică prin faptul că ei reprezintă forme de viaţă latentă, avînd procesele metabolice reduse la minim.

Sporii se întîlnesc cu regularitate la familia *Bacillaceae*, putîndu-se găsi foarte rar şi la unii coci şi spirili.

Sporul poate fi sferic sau ovoidal, avînd o dispoziţie şi dimensiuni variabile în funcţie de specie. Pe baza dimensiunilor şi dispoziţiei sporului, se poate face o subdivizare a bacililor sporulaţi în felul următor (Scanga):

A) *Bacteridii*: bacili cu spori al căror diametru este mai mic decît diametrul transvers al corpului bacilar şi deci nu modifică forma bacilului. Sporul poate fi sferic sau oval şi aşezat central sau subterminal.

B) *Clostridii*: bacili cu spori al căror diametru este mai mare decît diametrul corpului bacilar, modificînd astfel forma bacilului. Sporii, sferici sau ovalari, sînt aşezaţi central sau subterminal.

C) *Plectridii*: bacili cu spori a căror diametru este mai mare decît diametrul corpului bacilar, modificînd astfel forma bacilului. Sporii, sferici sau ovalari, sînt aşezaţi terminal.

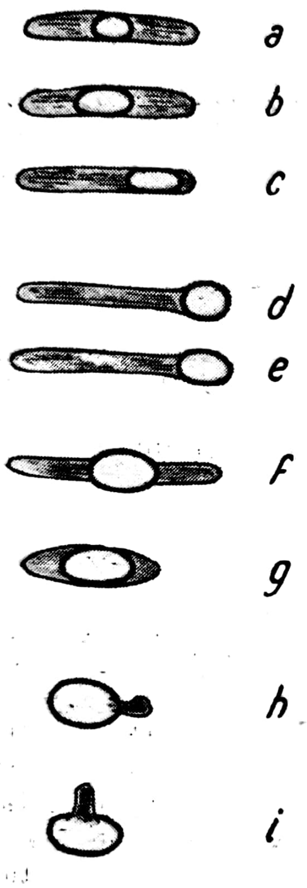


Fig. 20. — Spori bacterieni:

a—*c* — nu deformează peretele celular; *d*—*g* — deformează peretele celular: *h*—*i* — germinarea sporilor (Topley şi Wilson).

Aceste caractere variază în anumite limite la tulpini diferite, astfel că nu li se poate atribui o valoare absolută.

Sporii nu se colorează cu coloranţii obişnuiţi, datorită impermeabilităţii peretelui lor faţă de coloranţi. În preparatele necolorate apar ca formaţii refringente. Coloraţia reuşeşte abia după tratarea sporilor cu acizi (HCl) diluaţi, care le permeabilizează învelişul şi permite diferenţierea unei structuri interne. Sporularea este un caracter care poate fi pierdut spontan.

Citoplasma sporului este înconjurată de o membrană fină, denumită perete sporal, care va deveni peretele viitoarei celule vegetative. Peretele sporal este înconjurat de cel puţin două straturi: cortexul şi învelişul sporal. Cortexul înconjoară peretele, sau direct citoplasma sporului, ca o bandă omogenă sau stratificată, mai puţin densă decît învelişul. Învelişul sporal poate fi unic sau dublu şi el îmbracă cortexul. Suprafaţa învelişului prezintă adesea neregularităţi, evidenţiabile prin metode speciale. Învelişul poate fi înconjurat de o membrană denumită exosporiu, mai laxă la poli.

Formaţiile nucleare sînt depuse în general în partea periferică a masei interne a citoplasmei fiind incluzionate direct în aceasta, astfel că adesea în secţiune se văd figuri de inel, semilună sau V.

Sporii conţin o cantitate de apă mult mai redusă decît forma vegetativă, ceea ce ar explica rezistenţa lor mare faţă de căldură. Indicele de refracţie al sporului este apropiat de cel al proteinelor deshidratate.

Conţinutul în Ca şi Mg este mai ridicat în spori decît la forma vegetativă, pe cînd conţinutul în P şi K este mai scăzut. Calciul pare să aibă un rol în rezistenţa ridicată a sporilor, deoarece sporii rezultaţi într-un mediu sărac în calciu sînt mai puţin rezistenţi la căldură decît cei formaţi în medii bogate şi au un indice de refracţie mai mic decît la sporii normali.

În sporul de *B. megaterium* apare un lipid special, dipicolinatul de Ca, care este absent în celula vegetativă. Acesta se formează din acidul diamino-pimelic conţinut în peretele celulei vegetative.

Sporii bacterieni sînt bogaţi în lipide, care par să joace un rol important în termorezistenţă. De asemenea există cantităţi mari de ARN.

În spori lipsesc unele lipide care au fost descrise la formele vegetative, cum ar fi acidul β-hidroxibutiric.

De asemenea, în învelişul sporilor de *B. subtilis* şi *B. cereus* nu se găsesc monozaharide.

Sporii posedă o serie de enzime în stare activă (alaninracemaza, nucleoidribozidaza etc.), iar o alta în stare de repaus.

Pe lîngă o serie de antigene comune cu forma vegetativă sporii posedă şi antigene proprii, care nu se întîlnesc la forma vegetativă.

Sporogeneza este un caracter important al unor specii bacteriene, avînd un rol de seamă în taxonomie. Sporularea este un caracter care poate fi pierdut sau recuperat: într-o cultură de bacili sporogeni se găsesc adesea mutante care şi-au pierdut capacitatea de a sporula (Scanga). O serie de factori de mediu ca temperatura, pH, mediul de cultură, produsele de metabolism etc. pot influenţa favorabil sau nefavorabil sporularea.

Astfel, temperatura de 42° împiedică sporularea la *B. anthracis*: acest fapt i-a înlesnit lui Pasteur să obţină variante cu virulenţă scăzută. În general, acţiunea acestor factori variază cu specia.

De obicei, dintr-o celulă se formează numai un singur spor (monosporia). De aceea bacteriile multicelulare pot să prezinte mai mulţi spori în funcţie de numărul de celule, conţinut de bacteria respectivă.

Există cazuri excepţionale cînd dintr-o celulă iau naştere doi sau mai mulţi spori.

Procesul sporulării se poate împărţi în mai multe stadii (Scanga): a) stadiul preparator; b) stadiul de prespor; c) stadiul de apariţie a învelişurilor sporale şi d) stadiul de maturare a endosporului.

Stadiul *preparator* începe imediat ce cultura a încetat să crească. Într-o parte a celulei apar incluziuni lipoproteice refringente, în timp ce în partea opusă se observă apariţia unei condensări citoplasmice, care se colorează mult mai intens decît restul celulei. În acest stadiu lipseşte orice membrană limitantă a sporului.

Stadiul de *prespor* începe brusc, prin apariţia în jurul citoplasmei condensate a unei membrane. În acest stadiu, localizarea viitorului spor este aproape totdeauna terminală.

Stadiul de *apariţie a învelişurilor sporale* se caracterizează prin creşterea bruscă a refringenţei sporului, stadiu în care devine greu colorabil.

Stadiul de *maturare* se caracterizează prin reducerea dimensiunilor sporului şi fixarea lui în locul pe care-l ocupă definitiv în celulă. Incluziunile încep să se dezintegreze şi restul celulei se rupe, adesea înainte ca dezintegrarea să fie completă.

Urmează o perioadă de 2—4 ore, care corespunde probabil unei maturări interne, în care timp sporul nu germinează, chiar dacă este pus în condiţii favorabile de cultură. Abia după această perioadă sporul este capabil să germineze.

Sporii puşi în condiţii de mediu care favorizează creşterea vegetativă suferă un proces de germinare prin care dau naştere unei celule vegetative. Germinarea începe prin umflarea sporului şi reducerea densităţii şi refringenţei sale, fenomene datorite probabil măririi permeabilităţii învelişurilor şi creşterii sporului. Sporul începe să se coloreze uşor şi rezistenţa lui faţă de agenţii externi scade. Urmează apoi ruptura învelişurilor sporale şi prin fisura pereţilor iese extremitatea celulei vegetative. Ruptura poate avea loc la nivelul polului sporului (*germinare sporală*), ecuatorial (*germinare ecuatorială*) sau într-o zonă intermediară (*germinare intermediară*).

Pereţii sporului rămîn ataşaţi de o extremitate a celulei vegetative şi se dezintegrează, iar în alte cazuri sînt absorbiţi de celula vegetativă. Uneori, umflarea sporului nu este urmată de ruperea pereţilor, care sînt absorbiţi sau se dezintegrează (Scanga).

Din fiecare spor rezultă o singură celulă vegetativă. La bacteriile mobile, cilii pot să apară uneori în timpul germinării, iar alteori abia la a 2-a, a 3-a generaţie.

Nucleul sporului suferă o serie de modificări în timpul germinării, care au fost bine descrise de Robinow. În prima fază, nucleul sporului, care iniţial este net distinct, îşi pierde treptat conturul nemaiputînd fi distins de citoplasmă, probabil din cauza creşterii bazofiliei acesteia. În faza următoare, în masa citoplasmei, se individualizează structuri cromatinice de forme diverse, distribuite variat. Aceste structuri se reunesc în general, formînd o masă de substanţă cromatinică dispusă în centrul sporului. Urmează alungirea masei cromatinice centrale care suferă o gîtuire la mijloc.

Aşa după cum s-a arătat la început, în general condiţiile cerute pentru germinarea sporilor sînt aceleaşi, ca şi cele necesare dezvoltării vegetative. Totuşi există o serie de diferenţe între condiţiile optime cerute de cele două procese (optimul de temperatură mai îngust în cazul germinării, sensibilitatea la antiseptice mai mare la germinare, sensibilitatea mai redusă la penicilină decît a formei vegetative etc.).

Procesul de germinare, ca şi cel de sporulare, sînt ireversibile : dacă sporul a început să germineze, nu poate reveni imediat din forma vegetativă în forma de rezistenţă. Se presupune că sporularea este un proces endoergic, energia care este eliberată într-un mod oarecare în timpul germinării trebuind să fie acumulată din nou în faza de creştere, înainte ca celula să poată forma din nou sporul (Powell).

Protoplastul

Peretele celular contracarează presiunea osmotică ridicată din interiorul celulelor bacteriene, menţinîndu-le forma. În urma îndepărtării peretelui celular (de pildă la bacteriile Gram-pozitive cu ajutorul lizozimului, care hidrolizează mucopolizaharidul alcătuit din acetilaminopolizaharid), celulele se lizează. Dacă hidroliza pereţilor se face într-un mediu protector hipertonic, avînd o presiune osmotică de 20—25 de atmosfere, superioară presiunii osmotice din interiorul celulelor, acestea iau o formă sferică, putîndu-se menţine viabile timp de 24 de ore. Aceste formaţii, limitate la exterior de membrana citoplasmică, poartă numele de protoplaşti. Ca stabilizatori ai protoplaştilor se folosesc : zaharoză, soluţie 0,1—0,2 M; polietilenglicol 7,5%; NaCl 0,25—0,5 M; tampon fosfat 0,5 M (pH 7,0).

Dintr-o celulă rezultă un singur protoplast. De aceea bacteriile Gram negative, care sînt monocelulare, dau naştere unui singur protoplast, pe cînd bacteriile Gram pozitive, multicelulare, dau naştere mai multor protoplaşti.

Protoplaştii nu se formează, dacă cultura a fost încălzită în prealabil. Bacilii mai subţiri şi mai lungi formează protoplaşti mult mai rapid.

Lizozimul are acţiune electivă asupra pereţilor bacteriilor gram-pozitive. Nu toate tulpinile unei specii sînt la fel de sensibile la acţiunea lizozimului.

Tratarea bacteriilor Gram negative cu cantităţi milimolare de acid etilen-diamino-tetraacetic, le face sensibile la acţiunea lizozimului. Astfel s-au putut obţine protoplaşti la *Esch. coli.*

Lederberg obţine „protoplaşti" sub acţiunea penicilinei în bulion cu zaharoză şi Mg^{++} în cazul *Esch. coli*, considerîndu-i echivalenţii formelor globuloase din ciclul „L".

Alţi autori consideră însă că protoplaştii obţinuţi sub influenţa penicilinei nu sînt protoplaşti adevăraţi, avînd un rest de perete şi revenind la forma iniţială în lipsa acesteia.

Protoplaştii au o formă sferică indiferent de forma iniţială a bacteriei. Cilii rămîn ataşaţi de protoplast, fără însă ca acesta să-şi mai păstreze mobilitatea.

Protoplaştii se distrug prin uscare şi de aceea se fixează cu formol 4% timp de 24 de ore. Se colorează uşor cu coloranţii bazici.

Protoplaştii proveniţi din bacterii Gram pozitive se colorează Gram negativ.

S-a demonstrat creşterea şi un început de diviziune a protoplaştilor. Ei nu formează însă colonii.

În mediu cu stabilizatori, protoplaştii rămîn intacţi 24 de ore. Fierberea împiedică dezintegrarea lor. Stabilitatea protoplaştilor scade sub influenţa oxigenului, acţiune care este anihilată de cisteină. Ribonucleaza produce dezintegrarea şi liza protoplaştilor.

În urma lizei protoplaştilor rămîn „fantome" — contururi palide — care nu se colorează, reprezentînd membrana citoplasmică cu granulaţii de lipide care aderă de ea.

A fost pusă în evidenţă respiraţia protoplaştilor. Ea se intensifică în prezenţa glucozei, ceea ce indică activitatea enzimatică corespunzătoare. Protoplastul poate forma enzime adaptative.

Cu ajutorul aminoacizilor marcaţi s-a pus în evidenţă sinteza de proteine în interiorul protoplaştilor.

Multiplicarea celulei bacteriene

Multiplicarea celulei bacteriene poate avea loc după una din următoarele modalităţi : reproducerea prin sciziune simplă, reproducerea prin înmugurire şi ramificare ; reproducerea sexuată ; reproducerea după o modalitate mixtă (Scanga). În general se admite că modul cel mai comun de multiplicare a celulei bacteriene este diviziunea simplă, fiecare celulă divizîndu-se aproximativ în două părţi egale. La bacili şi la spirili, diviziunea celulei are loc întotdeauna perpendicular pe axul longitudinal al celulei. Cocii se divid după un singur plan sau după mai multe planuri, rezultînd dispoziţii caracteristice în frotiuri.

La bacili şi la spirili, diviziunea este precedată de o mărire de volum şi o alungire a corpului. La coci, modificările morfologice care preced diviziunea sînt mult mai puțin evidente și constau de obicei într-o ușoară alungire.

Diviziunea celulei bacteriene se desfășoară în trei faze succesive (Knaysi) : diviziunea citoplasmei, formarea peretelui transvers și separarea celor două celule fiice. Diviziunea citoplasmei este efectuată prin creșterea centripetă a unui sept transvers produs de membrana citoplasmică, în partea mediană a celulei și perpendiculare pe axul său longitudinal. Formarea peretelui transvers începe cu o constricție inelară a peretelui la nivelul septului transvers, de la care acesta se dezvoltă apoi progresiv, centripet, în grosimea septului citoplasmic. Urmează dedublarea peretelui transvers, urmată de separarea celor două celule fiice. Uneori, celulele nu se separă imediat după diviziune, rezultînd bacterii multicelulare, divizate prin septuri sau pereți transversali.

În condiții de dezvoltare favorabilă, multiplicarea are loc rapid, diferența între două diviziuni fiind de aproximativ 20 de minute la bacteriile cu creștere rapidă. Astfel, în 8 ore se formează 24 de generații și dintr-o celulă rezultă aproximativ 17 milioane de indivizi. Rapiditatea procesului de diviziune este o caracteristică a celulei bacteriene, de la care fac excepție cîteva specii, de pildă *M. tuberculosis*.

Pe lîngă reproducerea prin diviziune simplă, se mai poate întîlni reproducerea prin înmugurire și ramificare. Prima este întîlnită la *P. tularensis*, iar a doua la *M. tuberculosis*.

O modalitate de reproducere, a cărei realitate a fost pusă în evidență prin experiențele de recombinare, numai la un număr foarte restrîns de germeni, este reproducerea sexuată.

Probabil că bacteriile prezintă de fapt o modalitate de multiplicare mixtă, diviziunea simplă fiind mecanismul cel mai frecvent în condiții obișnuite, dar în funcție de condiții ele putînd apela și la mecanisme mai complexe.

Formele „L”

În sînul unei populații bacteriene pot să apară prin acțiunea unor factori interni, sau sub influența unor factori nefavorabili de mediu, cum ar fi antibioticele, bacteriofagii, radiațiile, anticorpii specifici asociați cu complementul, anumite substanțe chimice etc., variante lipsite de un perete rigid, care prezintă pe medii adecvate aspecte morfologice și culturale caracteristice, denumite forme „L”. Aceste aspecte sînt comune tuturor variantelor L, indiferent de specia de la care provin. Formele L au fost descrise pentru prima dată de Klieneberger-Nobel în 1935, în cazul culturilor de *Streptobacillus moniliformis*, fiind denumite de autoare astfel în onoarea Institutului Lister din Londra ; autoarea le considera în acel moment ca germeni de asociație, care contaminau cultura inițială. Ulterior Dienes a arătat că nu este vorba de o cultură mixtă, ci de variante particulare, care pot apărea la majoritatea germenilor sub influența unor factori nefavorabili. Forme „L” au fost descrise la *Proteus vulgaris*, *E. coli*, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, streptococi, stafilococi, vibrioni, *Salmonella*, *Shigella*, *Sphaerophorus funduliformis*, *Clostridium*, *Bacillus* etc.

Aspectele morfologice pe care le prezintă formele „L" sînt caracterizate prin prezenţa elementelor sferice de talii variind de la 125—250 mμ în cazul corpusculilor elementari, pînă la 5—10μ în cazul corpilor globuloşi. Corpusculii elementari cresc în dimensiuni pînă în momentul cînd prezintă un proces de înmugurire sau mai rar se divid direct. Corpii globuloşi care rezultă din creşterea exagerată a corpusculilor elementari, par să fie forme de involuţie. Ei se vacuolizează la interior şi se pot liza, punînd în libertate formaţiuni granulare, formate de ADN. Granulele rezultate nu sînt viabile, ele reprezentînd resturi celulare. Apariţia acestor granule a tentat pe unii autori să emită ipoteza ciclului L, susţinînd că granulaţiile ar reprezenta un stadiu filtrabil, subcelular, în viaţa germenului. Dar rigurozitatea experienţelor prin care a fost controlată viabilitatea granulelor nu lasă loc nici unei îndoieli asupra lipsei de semnificaţie, infirmînd ipoteza unui eventual ciclu L.

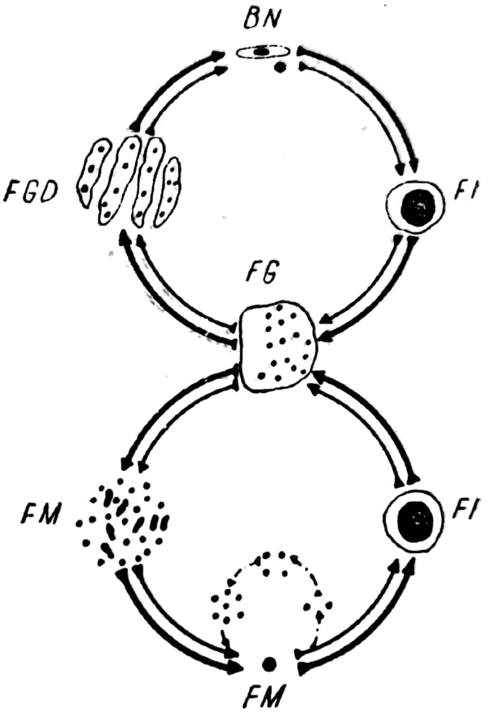


Fig. 21. — Reprezentarea schematică a ciclului „L"; *BN* — bacil normal; *FI* — formă intermediară; *FG* — formă gigantă; *FGD* — formă gigantă divizată; *FM* — formă mică (după Tulasne).

Formele „L" se dezvoltă numai pe medii de consistenţă moale, cu adaus de ser de cal 20%. Coloniile apar după o incubare de 3—7 zile fiind de două tipuri: 3A şi 3B.

Coloniile 3A sînt mici, încrustate în mediu, vizibile doar la microscop, fiind formate mai ales din elemente granulare. Ele revin greu la forma normală după îndepărtarea antibioticului.

Coloniile de tip 3B sînt mai mari, vizibile chiar cu ochiul liber, fiind formate dintr-un centru dens încrustat în mediu, alcătuit din granule şi o periferie mai transparentă, alcătuită din corpi globuloşi. Ele revin rapid la forma normală după îndepărtarea antibioticului.

Formele „L" nu se colorează cu coloranţii obişnuiţi. Din cauza fragilităţii lor, frotiurile trebuie făcute prin tehnica amprentelor, iar fixarea prin alcool sau formol. Coloraţia reuşeşte cu Giemsa. Coloniile formelor „L" pot fi examinate direct la microscopul cu contrast de fază sau colorate, prin aplicarea pe suprafaţa mediului a unei lamele, pe care s-a uscat o picătură de colorant.

Formele „L" se deosebesc de bacteriile normale din care provin, printr-o serie de proprietăţi ca: fragilitate, rezistenţă la antibiotice, în special la penicilină, necesităţi nutritive speciale mai ales în proteine native, dezvoltarea dificilă în medii lichide şi formarea lentă de colonii de un tip particular pe medii solide.

Formele „L" păstrează o serie de proprietăţi ale bacteriei originale la fermentarea zaharurilor, producerea de indol şi hidrogen sulfurat, dar procesele respective se desfăşoară cu o intensitate redusă. De asemenea, consumul de oxigen este de patru ori mai redus la formele „L” decît la bacteriile normale.

Constituţia antigenică a formelor „L” este asemănătoare cu cea a bacteriilor din care provin, dar lipseşte antigenul „H”, care reapare în momentul în care bacteria revine la ciclul de dezvoltare normal.

Formele „L” au o patogenitate redusă, dar pot vaccina contra infecţiilor determinate de bacteriile normale. S-au descris şi forme „L” patogene.

Formele „L” prezintă multe puncte comune cu genul *Mycoplasma*, pe care unii autori îl consideră ca reprezentînd forme „L” stabilizate.

După Lederberg, variaţia „L” apare în momentul în care bacteriile sînt împiedicate să-şi sintetizeze componenta parietală rigidă fie din cauza unor factori extrinseci (de pildă, adăugarea la mediu a penicilinei etc.), fie din cauza unor factori intrinseci (pierderea capacităţii respective în urma unor mutaţii). Ultimul mecanism ar explica apariţia în unele cazuri a formelor „L” în mod spontan, în lipsa unor factori nefavorabili.

Înlăturarea factorilor extrinseci sau adăugarea substanţelor a căror sinteză nu mai poate fi făcută (acid diaminopimelic), duce la reluarea aspectului normal.

Aparatura optică

Dr. Al. Săsărman

Microscopul

Bacteriile, avînd dimensiuni de ordinul micronilor (1 μ = 0,001 mm), nu pot fi văzute cu ochiul liber, ceea ce explică de ce existența lor, intuită de cîteva minți geniale, a fost ignorată timp de milenii, pînă în clipa cînd tehnica a fost în măsură să compenseze suficient lipsurile acuității noastre vizuale.

Oamenii au utilizat lentilele pentru a obține măriri aparente ale obiectelor, cu scopul de a distinge detalii care scăpau ochiului neînarmat, cu mult înainte de descoperirea bacteriilor; dar numai combinarea lentilelor într-un anumit fel, între ele, a permis lui Leeuwenhoek să descopere, în 1683, microscopul, descriind primele microorganisme văzute de un ochi omenesc.

Perfecționarea microscopului a progresat lent; abia la mijlocul secolului al XIX-lea s-a ajuns la un nivel calitativ suficient, care să permită, alături de alte condiții, apariția epocalelor descoperiri ale lui Louis Pasteur.

Astăzi microscopul este un instrument nelipsit în orice laborator, utilizările lui depășind cu mult sfera biologiei.

Generalități asupra lentilelor. Lentilele sînt corpuri transparente, cu un indice de refracție superior aerului, limitate de două suprafețe curbe, sau una plană și una curbă, care produc convergența sau divergența razelor luminoase. Lentilele cu fețe convexe sînt convergente, cele cu fețe concave sînt divergente.

Pentru a înțelege modul de formare a imaginii de către o lentilă convexă, trebuie să urmărim drumul parcurs de o rază luminoasă cînd trece printr-o lentilă. Deoarece materialul din care sînt construite lentilele are un indice de refracție mai mare decît aerul, razele care pătrund în lentilă vor suferi fenomenul de refracție. Conform legilor refracției, orice rază avînd o incidență diferită de cea normală, pe suprafața unui obiect transparent cu un indice de refracție mai mare decît al aerului, se va apropia de normală în punctul de incidenţă în momentul intrării în obiect şi se va îndepărta de ea la ieşirea din obiect. Razele care cad perpendicular nu sînt refractate. În cazul lentilelor, aceasta înseamnă că raza care reprezintă axul optic al lor nu suferă fenomenul de refracţie, pe cînd razele paralele cu axul optic sînt refractate, şi anume cu atît mai mult, cu cît sînt mai îndepărtate de acesta. Datorită acestui fapt, toate razele paralele cu axul optic se întîlnesc într-un punct situat pe ax, dar pe partea opusă a lentilei, punct care poartă denumirea de focar. Distanţa care separă acest punct de centrul lentilei poartă numele de distanţă focală. Ea este invers proporţională cu puterea de mărire, care se obţine divizînd distanţa vederii normale (250 mm), prin distanţa focală.

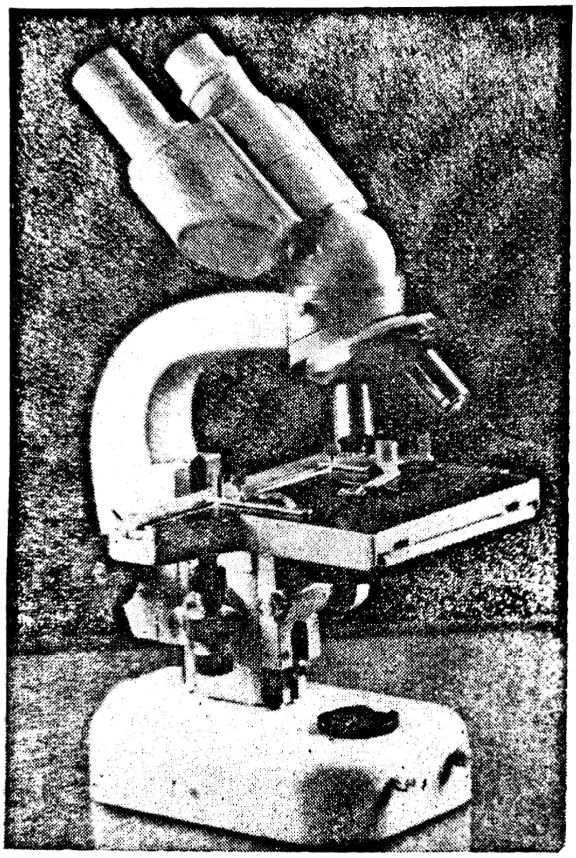


Fig. 22.—Microscop binocular I.O.R. (Industria optică romînă).

În mod schematic, imaginea furnizată de o lentilă se obţine figurînd imaginile diferitelor puncte care alcătuiesc obiectul. Imaginea unui punct se obţine ţinînd seama de faptul că raza care trece prin centrul lentilei nu suferă practic deviaţii, iar razele paralele cu axul optic converg în focar. La intersecţia celor două drepte găsim imaginea căutată a punctului.

Se definesc ca imagini reale imaginile care pot fi prinse pe un ecran, fiind formate de raze convergente în partea opusă obiectului. Se definesc ca imagini virtuale imaginile care nu pot fi prinse pe un ecran, fiind formate de raze divergente. Observatorul vede aceste imagini în prelungirea razelor divergente, de partea obiectului.

În funcţie de locul pe care-l ocupă obiectul în raport cu focarul unei lentile convexe, pot surveni în privinţa imaginii 3 cazuri diferite.

Dacă obiectul este situat la o distanţă mai mare de lentilă decît dublul distanţei focale, atunci se va obţine o imagine reală, răsturnată şi micşorată cu atît mai mult, cu cît obiectul este mai îndepărtat. Acesta este cazul obiectelor fotografice.

Dacă obiectul este situat la o distanţă mai mare decît distanţa focală, dar mai mică decît dublul distanţei focale, imaginea va fi reală, răsturnată şi mărită, cu atît mai mult, cu cît obiectivul este mai apropiat de focar. Acesta este cazul obiectivelor de microscop.

În sfîrşit, dacă obiectul este situat la o distanţă mai mică decît distanţa focală, imaginea va fi virtuală, dreaptă şi cu atît mai mare cu cît obiectul este mai apropiat de focar. Acesta este cazul lupelor şi al ocularelor de microscop, care funcţionează ca nişte lupe.

Lentilele prezintă o serie de abateri de la schema ideală de formare a imaginii, care poartă denumirea de aberații. Acestea pot fi de mai multe feluri și dintre ele vom cita doar aberația sferică și aberația cromatică.

Aberația sferică constă în lipsa de uniformitate a indicelui de refracție pentru toate razele pornite dintr-un punct al obiectului și care traversează lentila; razele periferice sînt refractate mai puternic decît cele centrale. Aceasta face ca razele care pornesc dintr-un punct oarecare să nu se întîlnească toate în același loc, astfel încît imaginea unui punct apare sub forma unui cerc. Gradul aberației sferice este în funcție de curbura lentilei.

Corectarea acestei aberații se face asociind o lentilă convexă și una concavă, cu curburi egale, care vor avea deci aberații sferice egale, dar de sens contrar; lentila convexă se construiește dintr-un material cu un indice de refracție superior indicelui de refracție al lentilei concave, astfel că sistemul în totalitate se va comporta ca o lentilă convergentă. Corectarea se poate face în exces, sau în minus. Corectarea aberației sferice poartă numele de aplanetism.

Aberația cromatică este datorită unei refracții inegale a diferitelor raze ale spectrului. Acest lucru va face ca diferitele culori ale spectrului să aibă focarul situat în puncte diferite, razele violete fiind mai puternic refractate decît cele roșii, obținîndu-se imagini cu contururi neclare și colorate.

Corectarea acestei aberații (acromatismul) se face asociind lentile cu aberații cromatice egale, dar de sens contrar, păstrînd convergența sistemului. Corectarea se face de obicei în minus, realizîndu-se prin suprapunerea imaginilor furnizate de două laturi ale spectrului.

O corectare mai perfectă se face prin suprapunerea imaginilor furnizate de 3 din culorile spectrului (apocromatism).

Principiul microscopului

În principiu, microscopul este format din două sisteme de lentile: *1*) obiectivul, care dă o imagine reală, răsturnată și mărită a obiectului situat în apropierea focarului și în afara lui; *2*) ocularul, care, acționînd ca o lupă, reia imaginea furnizată de obiectiv, situată înăuntrul focarului ocularului, și o transformă într-o imagine virtuală dreaptă și mărită în raport cu prima imagine. Astfel imaginea finală va fi virtuală, răsturnată și mult mărită în raport cu obiectul.

Mărirea totală a microscopului rezultă din produsul măririlor parțiale date de cele două sisteme de lentile. Această mărire nu poate să depășească de 1 000 ori apertura numerică a obiectivului.

Descrierea microscopului

Din considerente didactice se obișnuiește să se împartă microscopul într-o parte mecanică și o parte optică. Ultima este formată din sistemul de iluminare și din microscopul propriu-zis. Descrierea noastră va urma această împărțire.

Partea mecanică este constituită din picior, platină și tub. Piciorul, avînd drept scop să dea stabilitate microscopului, este în general în forma unei potcoave, pe care se fixează o tijă, care susține tot restul aparatului. Uneori tija posedă un ax orizontal care permite înclinarea microscopului înainte şi înapoi. La modelele cu tub cudat, care face ca ocularul să aibă o poziţie înclinată, acest ax devine inutil.

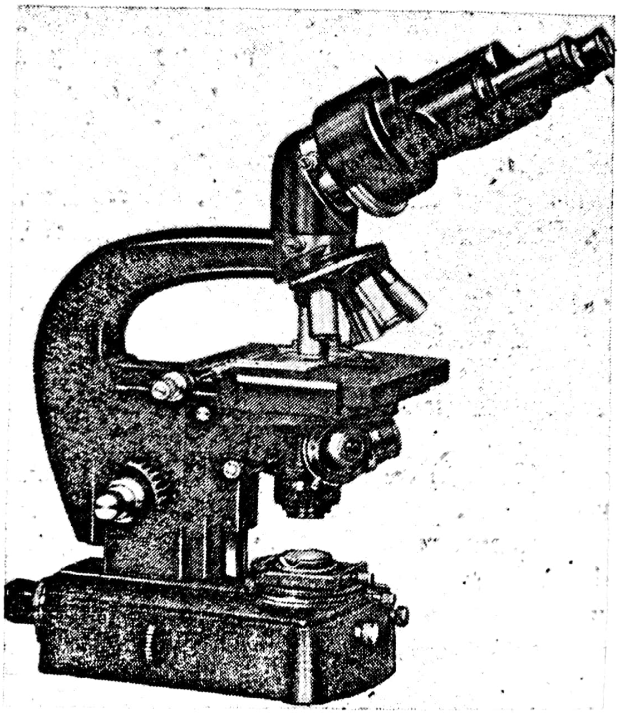


Fig. 23. — Microscop binocular Zeiss-Jena.

Platina, formată dintr-o placă avînd un orificiu central pentru trecerea razelor, serveşte la susţinerea preparatului. Există platine rotunde care pot fi deplasate pe distanţe scurte într-un plan orizontal, cu ajutorul a două vize şi platine patrate pe care, în cele mai multe cazuri, este fixat un cărucior care permite deplasarea preparatului în două direcţii : anteroposterior şi lateral.

Platina mai prezintă doi valeţi, care servesc la fixarea preparatului.

Tubul conţine partea optică propriu-zisă a microscopului. El este legat de picior prin două angrenaje, care permit deplasarea lui în sus şi în jos, în vederea punerii la punct a imaginii. Unul dintre angrenaje, viza macrometrică, efectuează deplasarea rapidă, pe cînd viza micrometrică asigură deplasarea lentă, necesară pentru punerea la punct de precizie a imaginii microscopice.

În porţiunea inferioară a tubului se înşurubează obiectivele, pe cînd în porţiunea superioară se fixează ocularul. Pentru schimbarea uşoară a obiectivelor între ele, capătul inferior al tubului este prevăzut cu un revolver în care se înşurubează obiectivele (3—5). Simpla rotire a revolverului duce la înlocuirea unui obiectiv cu altul.

Sistemul de iluminare. Partea optică este compusă din două părţi : sistemul de iluminare şi partea optică propriu-zisă.

Dispozitivele de iluminare sînt compuse dintr-o sursă de lumină şi un sistem care concentrează razele luminoase în planul obiectului. La microscoapele moderne sistemul de iluminare face corp comun cu restul microscopului. La modelele vechi sursa de lumină este independentă, putîndu-se folosi, fie lămpi speciale, fie lămpi improvizate sau lumina naturală, ultima fiind cea mai puţin recomandată. Lămpile speciale cele mai recomandate sînt acelea care folosesc becuri de mic voltaj, avînd un filament de tungsten de dimensiune redusă, adus la incandescenţă, care dă o lumină de mare intensitate şi relativ uniformă, fiind prevăzute cu o lentilă colectoare şi un diafragm iris (diafragm de cîmp). În lipsa lămpilor speciale se utilizează adesea becuri obişnuite, cu un colector improvizat dintr-un balon umplut cu apă şi un diafragm tăiat din carton.

Cînd este vorba de măriri mici, acest sistem este suficient, lumina fiind îndreptată asupra obiectivului prin intermediul unei oglinzi plane. La măriri mari însă, între sursa de lumină şi obiect se interpune condensatorul format dintr-un sistem de lentile convergente, care au drept scop să concentreze fasciculul luminos asupra obiectivului. Condensatorul posedă în planul focal anterior (spre sursa de lumină) un diafragm iris. Conform principiului Kohler, lentila colectoare a sursei de lumină trebuie să formeze imaginea filamentului acesteia în planul focal al condensatorului, adică la nivelul deschiderii diafragmului iris. Numai în acest fel se asigură o iluminare corectă, uniformă, a obiectului. Diafragmul de cîmp se închide pînă la nivelul cîmpului microscopic, ceea ce se realizează privind preparatul cu un obiectiv slab. De asemenea, diafragmul iris al condensatorului se închide astfel ca numai 1/2—2/3 din deschiderea obiectivului să fie iluminat, ceea ce se realizează privind în tubul microscopului după scoaterea ocularului.

Cele două diafragmări sînt necesare, deoarece razele laterale, care nu au nici un rol în formarea imaginii, dăunează unei bune observaţii. Aceste operaţii se execută după ce am efectuat centrarea luminii, adică după ce ne-am convins că sursa de lumină se găseşte pe axul sistemului optic.

În cazul în care sursa de lumină face corp comun cu restul microscopului, centrarea se face cu ajutorul unui dispozitiv special.

Pentru mărirea contrastului la nivelul imaginii se utilizează frecvent filtre de sticlă colorate, avînd culori complementare în raport cu coloranţii folosiţi, care se fixează la nivelul diafragmului condensatorului.

Obiectivul. Partea optică propriu-zisă este formată din două sisteme de lentile, care formează obiectivul şi ocularul; aşa după cum s-a arătat, obiectivul dă o imagine reală, mărită şi răsturnată a obiectului.

Puterea de rezolvare a unui microscop, adică capacitatea de a distinge detalii cît mai fine, depinde de obiectiv.

Puterea de rezolvare a unui obiectiv este cu atît mai mare, cu cît permite intrarea unui număr mai mare de raze difractate, cu importanţă capitală în formarea imaginii microscopice. Această proprietate este în funcţie de unghiul de deschidere a microscopului. Puterea de rezolvare a unui obiectiv mai depinde şi de cantitatea de raze primite, ceea ce este în funcţie, atît de unghiul de deschidere, cît mai ales de mediul interpus între preparat şi lentila frontală a obiectivului. Într-adevăr, atunci cînd acest mediu este reprezentat de aer, cum este cazul la obiectivele uscate, un mare număr de raze se pierd, datorită refracţiei totale la nivelul feţei superioare a lamei. Cînd însă între preparat şi lentila frontală a obiectivului este interpus un mediu cu un indice de refracţie apropiat de cel al sticlei (ulei de cedru), cum este cazul la obiectivele de imersie, pierderea de raze este neglijabilă.

Cele două valori de mai sus au fost reunite într-un indice important, numit apertura numerică, care reprezintă produsul dintre sinusul jumătăţii unghiului de deschidere al obiectivului şi indicele de refracţie al mediului interpus între preparat şi obiectiv:

$$a = i \cdot \sin \frac{\alpha}{2}$$

Acest indice este inferior lui 1 în cazul obiectivelor uscate şi poate ajunge pînă la valori de 1,40 în cazul obiectivelor de imersie obişnuite. El este gravat pe fiecare obiectiv.

Puterea de rezolvare mai depinde şi de lungimea de undă a radiaţiei luminoase în care se face observaţia, fiind invers proporţională cu aceasta.

Astfel, puterea de rezolvare este direct proporţională cu apertura numerică şi invers proporţională cu lungimea de undă a luminii. Ea se exprimă prin distanţa minimă la care două puncte pot fi văzute distinct, distanţă care este cu atît mai mică, cu cît puterea de rezolvare este mai mare.

Astfel :

$$d = \frac{\lambda}{2 \cdot a}$$

căci *d* (distanţa minimă) este inversul puterii de rezolvare. Această distanţă minimă este egală în mod teoretic pentru un obiectiv de imersie avînd $a = 1{,}40$ la o examinare în lumină albastră, cu $\frac{0{,}4666}{2{,}80}\ \mu = 0{,}16\ \mu$.

Controlul puterii de rezolvare a unui obiectiv se face folosind preparate test de diatomee, care prezintă striaţii foarte fine şi apropiate. Pentru obiectivele de imersie se folosesc preparatele de *Surirella gemma*, iar pentru obiectivele uscate puternice, preparatele de *Pleurosigma angulatum*.

Puterea de mărire a unui obiectiv reprezintă raportul dintre distanţa vederii normale (250 mm) şi distanţa focală a obiectivului. Ea este gravată pe fiecare obiectiv.

Puterea definisantă a unui obiectiv, adică facultatea de a furniza imagini cu contururi nete, depinde de corecţia aberaţiilor.

Luminozitatea unui obiectiv depinde de apertura sa numerică, variind, la obiective cu puteri de mărire egale, proporţional cu pătratul aperturii numerice.

Pe lîngă puterea de mărire şi apertura numerică, obiectivele uscate puternice au gravată grosimea lamelei pentru care s-a făcut corecţia aberaţiilor, recomandîndu-se utilizarea numai a lamelelor respective.

În funcţie de corecţiile suferite, obiectivele pot fi acromatice sau apocromatice.

De asemenea, în funcţie de mediul interpus între preparat şi obiectiv, acestea se împart în obiective uscate şi de imersie, ultimele au gravate literele H I sau Oël sau I.

Ocularul. Ocularul, funcţionînd ca o lupă, măreşte imaginea furnizată de obiectiv şi o transformă într-o imagine virtuală.

Se cunosc 3 tipuri de oculare : oculare Huyghens, oculare Ramsden şi oculare compensatoare.

Ocularele Huyghens, formate din două lentile dispuse la extremităţile unui tub, prezintă focarul inferior între cele două lentile, de unde denumirea de oculare negative (ele nu pot fi folosite ca lupe). Lentila superioară poartă numele de lentilă frontală, iar cea inferioară, de lentilă colectoare. Între ele, la nivelul planului imaginii furnizate de obiectiv se găseşte un diafragm, care are drept scop limitarea cîmpului microscopic.

În timp ce lentila frontală este răspunzătoare de mărirea dată de ocular, lentila colectoare reduce curbura cîmpului, dar micşorează în acelaşi timp mărirea dată de lentila frontală.

Deşi lentilele din care sînt făcute aceste oculare nu sînt acromatice, totuşi ele furnizează o imagine aproape acromatică.

Ocularele de tip Ramsden, numite şi oculare pozitive (ele pot fi utilizate ca lupe), au focarul inferior situat sub cele două lentile, unde se găseşte şi diafragmul. Datorită unei aberaţii cromatice puternice, ele nu se mai utilizează decît la măsurători de precizie, pentru care prezintă avantaje în raport cu ocularele Huyghens, deoarece scara micrometrică este mărită de ambele lentile, fiind situată la nivelul diafragmului.

Ocularele compensatoare se folosesc pentru a corecta inegalitatea de mărire pentru diverse culori ale obiectivelor apocromatice.

În afară de ocularele amintite mai sus, există oculare aplanetice, periplanetice, de proiecţie etc.

Pe fiecare ocular este gravată puterea de mărire, iar pe cele compensatoare, în plus, litera K.

Formarea imaginii la microscop. *Teoria Abbé.* Detaliile fine pe care trebuie să le rezolve un microscop se pot compara cu o reţea, sub influenţa căreia razele pornite de la nivelul sursei de lumină suferă fenomenul de difracţie. Din punct de vedere optic, o reţea este constituită de o serie de spaţii transparente şi opace, dispuse alternativ şi foarte apropiate, în număr de cel puţin 40 pe 1 mm.

Conform teoriei elaborate de Abbé imaginea la microscop a unui obiect este produsă de interferenţa razelor emise de spectrele de difracţie, fiind deci o imagine secundară.

Pentru ca imaginea să fie cît mai fidelă, este necesar în obiectiv să pătrundă o zonă cît mai mare din spectrele de difracţie, ceea ce se obţine prin mărirea unghiului de deschidere al obiectivului, de unde rezultă importanţa aperturii numerice pentru puterea de rezolvare a unui microscop. În general, pentru ca un detaliu să fie rezolvat de microscop este necesar ca în obiectiv să pătrundă cel puţin prima maximă de difracţie.

Aceste maxime de difracţie se observă dacă privim prin microscopul fără ocular un preparat de diatomee. Vom vedea un cerc alb central şi cercuri colorate la periferie.

Modul de utilizare a microscopului

În general germenii pot fi studiaţi la microscop, fie necoloraţi, sub formă nativă, fie coloraţi, în preparate fixate.

Examenul unui preparat nativ. În acest caz, germenii se găsesc suspendaţi într-un mediu lichid, care se depune sub forma unei picături, fie pe o lamelă, peste care se aşază o lamă cu godeu şi apoi lama cu lamela se răstoarnă (picătură suspendată), fie pe o lamă, acoperindu-se picătura cu o lamelă.

Aşa cum s-a arătat, grosimea lamelei trebuie să fie cea înscrisă pe obiectivul respectiv. Acest examen se foloseşte pentru a observa mobilitatea germenilor şi mai puţin pentru detalii morfologice care apar, de obicei, şterse.

Pentru examenul unui preparat nativ se folosesc de obicei obiectivele uscate puternice (40×), diafragmînd mult lumina.

Punerea la punct a cîmpului microscopic se face în general în trei timpi. În primul timp, ne apropiem cu obiectivul de preparat cu ajutorul vizei macrometrice, privind lateral. În timpul al doilea, privim în microscop şi urcăm cu ajutorul vizei macrometrice pînă cînd apare cîmpul microscopic. Ultimul timp constă în punerea precisă la punct a cîmpului microscopic, cu ajutorul vizei micrometrice.

Examenul unui preparat colorat. Acest examen se utilizează pentru studiul morfologiei germenilor, care sînt fixaţi şi coloraţi.

Fixarea se poate face fie prin procedee fizice, fie prin procedee chimice (vezi coloraţiile). De obicei se utilizează fixarea prin căldură, care se execută trecînd lama cu preparatul uscat de 3 ori prin flacăra unui bec cu gaz.

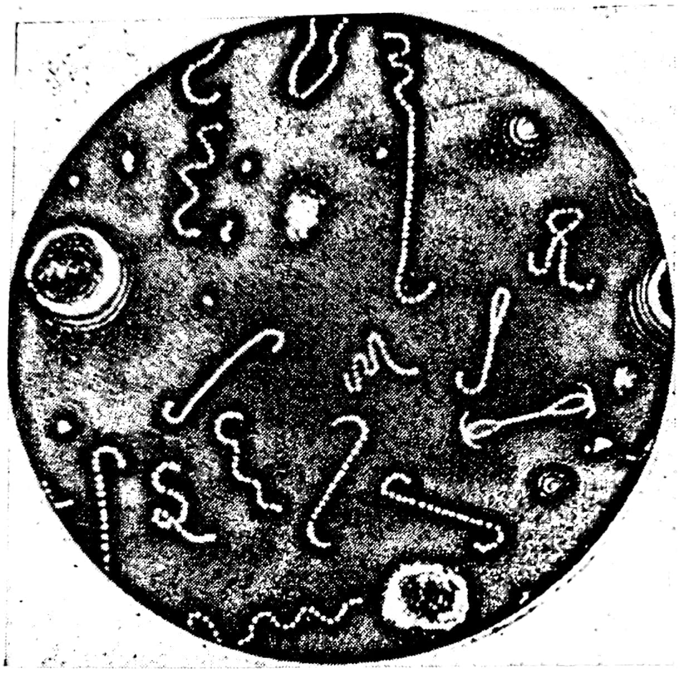


Fig. 24. — Cîmp microscopic pe fond întunecat (Topley şi Wilson).

După fixare, preparatele se colorează, folosindu-se diverse tehnici, în funcţie de scopul urmărit. Examenul preparatelor colorate se face cu ajutorul obiectivelor de imersie, depunîndu-se pe preparat o picătură de ulei de cedru care are un indice de refracţie apropiat de cel al sticlei (1,51).

Examenul microscopic pe fond întunecat este bazat pe fenomenul Tyndall. Cînd o rază de lumină pătrunde într-o cameră întunecată printr-o deschizătură, traiectoria sa devine vizibilă prin faptul că particulele de praf din calea ei, invizibile la lumina obişnuită, apar luminate pe un fond întunecat, deoarece reflectă lumina în toate părţile, în timp ce fondul nu se luminează. Fenomenul se poate observa numai în cazul în care ochiul observatorului nu primeşte raze directe, ci doar raze reflectate de particulele de praf.

S-a căutat să se utilizeze în microscopie acest principiu, rezultînd examenul microscopic pe fond întunecat, care se realizează prin luminarea preparatului cu raze laterale, care nu pătrund în obiectiv, suferind în parte o reflexie totală la nivelul feţei superioare a lamelei.

Astfel, fondul va apărea întunecat în timp ce diversele particule, în cazul nostru bacteriile, vor apărea luminate, observîndu-se net contururile lor.

Pentru examenul pe fond întunecat este necesară o sursă foarte puternică de lumină, prevăzută neapărat cu un sistem colector. Pentru a evita pierderile de lumină, între condensator şi lamă se depune o picătură de lichid cu indice de refracţie ridicat.

Pentru obţinerea unei iluminări laterale se folosesc diferite tipuri de condensatoare (paraboloid, cardioid etc.), care au porţiunea centrală opacă, intrarea razelor de lumină făcîndu-se în porţiunea laterală transparentă, în formă de inel.

Pentru examen se folosesc, fie obiective uscate puternice, fie obiective de imersie cu dispozitive de diafragmare, pentru a elimina eventualele raze directe care ar putea pătrunde în obiectiv, din cauza unghiului mare de deschidere a acestor obiective.

Examenul pe fond întunecat se execută pe preparate native, constituite din germeni suspendați într-un mediu lichid, perfect transparent, între lamă și lamelă. Acest examen se utilizează mai ales pentru germeni dificil de colorat prin metodele obișnuite (*Treponema*, *Leptospira*), în celelalte cazuri metoda fiind inferioară examenului germenilor în stare colorată.

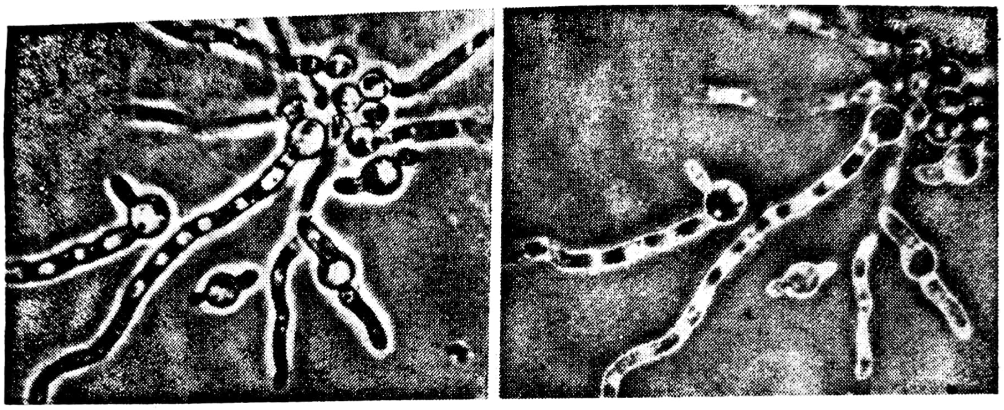


Fig. 25. — Aspect microscopic prin contrast de fază:
stînga — contrast de fază pozitiv; *dreapta* — contrast de fază negativ.

Microscopia prin contrast de fază. Pentru examenul preparatelor native, necolorate, se obțin rezultate optime, folosindu-se microscopia prin contrast de fază. Principiul acestui microscop a fost descoperit de fizicianul olandez Zernicke, în 1934, dar realizarea lui practică s-a făcut ceva mai tîrziu.

Pentru ca detaliile unui obiectiv privit prin transparență, cum este cazul la microscop, să poată fi distinse, trebuie fie să fie colorate diferit, fie să absoarbă lumina diferit. În ultimul caz, razele de lumină care trec prin preparat vor avea amplitudini diferite, obținîndu-se deci un contrast de amplitudine: unele detalii vor apărea mai clare, altele mai întunecate.

Diferitele detalii de structură ale bacteriilor diferă foarte puțin între ele în privința capacității de absorbție a luminii, ceea ce face ca ele să nu poată fi deosebite decît pe baza afinității lor diferite pentru coloranți. Deși razele de lumină nu-și micșorează amplitudinea în urma trecerii prin preparatul nativ, totuși ele suferă o întîrziere care dă naștere la diferențe de fază ale undelor care alcătuiesc imaginea (contrast de fază).

Acest contrast de fază nu poate fi sesizat de ochi.

Prin întîrziere de fază se înțelege rămînerea în urmă a unei vibrații în raport cu cealaltă, astfel că trecerea într-un anumit sens prin punctul O se face în momente diferite. Atunci cînd în cazul a două unde coherente, de amplitudini egale, diferența de fază este de $\frac{\lambda}{2}$, ele se vor anula în urma fenomenului de interferență.

Studiindu-se imaginea de difracţie secundară a sursei de lumină, s-a observat că în cazul contrastului de amplitudine ea este formată din unde în faza identică cu undele imaginii principale, cele două unde avînd amplitudini apropiate. În urma interferenţei razelor provenite din imaginea principală şi din imaginea de difracţie secundară vor rezulta contraste puternice.

În cazul contrastului de fază, imaginea de difracţie secundară a sursei de lumină este formată din unde întîrziate faţă de undele imaginii principale cu $\frac{\lambda}{4}$, avînd o amplitudine foarte mică în raport cu aceasta. Pentru a se obţine diferenţe de contrast, ca şi în cazul contrastului de amplitudine, este necesar ca undele imaginii de difracţie secundară să fie aduse într-o fază identică cu faza undelor imaginii principale. În al doilea rînd este necesar să se reducă mult amplitudinea razelor imaginii principale a sursei de lumină. Acest lucru se realizează prin aşezarea în calea fasciculului principal a unei plăci de fază absorbante, care întîrzie unda cu $\frac{\lambda}{4}$ şi reduce mult amplitudinea ei, apropiind-o de amplitudinea razelor pornite din imaginile secundare de difracţie ale sursei de lumină.

Astfel, razele care pornesc din imaginile de difracţie secundare vor fi în fază identică cu razele pornite din imaginea principală a sursei de lumină, obţinîndu-se aşa-zisul contrast de fază pozitiv, în care obiectele care provoacă o întîrziere de fază apar mai întunecate decît restul mediului.

În prezent, plăcile de fază montate în obiectiv au o formă inelară şi în mod corespunzător sursa de lumină este tot inelară.

Pentru examen se foloseşte o sursă puternică de lumină şi un filtru verde.

Obiectivele cu placă de fază au gravate pe ele literele Ph.

Punerea la punct a microscopului se face în felul următor: întîi se pune la punct preparatul în mod obişnuit. Apoi se înlocuieşte ocularul cu o lupă şi căutăm ca, variind apertura condensatorului şi centrînd diafragmul inelar al sursei de lumină, să suprapunem imaginea inelului luminos peste imaginea întunecată a plăcii de fază. Repunem ocularul şi examinăm preparatul. Punerea la punct se execută ori de cîte ori se schimbă obiectivul sau preparatul.

Cu ajutorul microscopiei prin contrast de fază se pot pune în evidenţă în preparate native, necolorate, umede (între lamă şi lamelă), detalii morfologice, care nu pot fi demonstrate decît prin coloraţii speciale, dificile. Acest lucru reprezintă avantajul esenţial al microscopiei prin contrast de fază.

Efectuarea măsurătorilor la microscop. Pentru efectuarea măsurătorilor la microscop ne servim de micrometrul ocular. Acesta reprezintă un ocular în care, la nivelul diafragmului s-a introdus, cu faţa în jos, o placă de sticlă pe care sînt gravate 100 de diviziuni, de la o extremitate pînă la cealaltă a cîmpului. Acest micrometru ocular se etalonează în raport cu o scară micrometrică, gravată pe o lamă, şi care poartă numele de micrometru obiectiv. Micrometrul obiectiv este gradat din 10 în 10 μ.

Pentru etalonarea micrometrului ocular punem la microscop micrometrul obiectiv, folosind obiectivul cu care urmează să lucrăm în timpul efectuării măsurătorilor. După punerea la punct a scării micrometrice observăm raportul dintre diviziunile celor două micrometre. Ştiind că o diviziune a micrometrului obiectiv corespunde cu 10μ, este uşor de calculat valoarea unei diviziuni a micrometrului ocular.

După efectuarea etalonării, înlocuim micrometrul obiectiv cu preparatul pe care vrem să efectuăm măsurătorile şi, ştiind valoarea unei diviziuni a micrometrului ocular, este uşor să determinăm dimensiunile pe care le căutăm.

Microscopul electronic

S-a arătat mai sus că puterea de rezolvare, exprimată prin distanţa minimă la care două puncte pot fi văzute separat, depinde de apertura numerică şi de lungimea de undă.

Dar, în timp ce apertura numerică variază în limite restrînse, lungimea de undă a diferitelor vibraţii variază enorm. Astfel, pentru creşterea importantă a puterii de rezolvare a microscopului este necesar să se recurgă la reducerea lungimii de undă a vibraţiilor, înlocuind lumina printr-un fascicul de electroni. Lungimea de undă a fasciculului de electroni este de 100 000 de ori mai mică decît cea a luminii, astfel că, teoretic puterea de rezolvare a unui microscop electronic este de 100 000 de ori mai mare decît a unui microscop obişnuit.

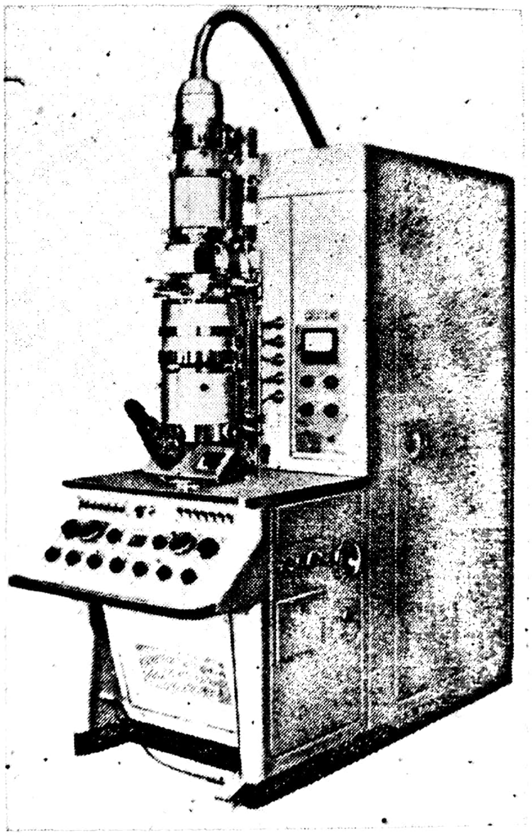


Fig. 26. — Microscop electronic J.E.M. — 5 γ (putere de rezolvare la 10 Å).

În practică însă, din cauza aberaţiilor, nu se pot atinge puteri de rezolvare sub 5 Å (0,5 mμ).

Spre deosebire de lumina obişnuită, fasciculul de electroni nu este influenţat de lentilele de sticlă, ci numai de un cîmp creat de lentile electrostatice sau magnetice. De aceea, microscopul electronic posedă în locul lentilelor de sticlă, lentile electrostatice sau electromagnetice.

Există 3 asemenea lentile: lentila condensoare, lentila-obiectiv şi lentila proiectoare. Electronii emişi de catod sînt întîi acceleraţi de un cîmp creat prin înaltă tensiune. Apoi lentila condensoare concentrează fasciculul de electroni asupra preparatului (germeni depuşi pe o peliculă de colodiu). La nivelul preparatului, electronii sînt dispersaţi proporţional cu densitatea şi grosimea preparatului. Electronii dispersaţi sînt reţinuţi de un diafragm, care nu permite decît trecerea porţiunii centrale a fasciculului.

După trecerea prin preparat, fasciculul electronic suferă influența primei lentile, rezultînd o primă imagine electronică, care este apoi reluată și proiectată pe un ecran fluorescent sau pe o peliculă fotografică, de către lentila proiectoare. În interiorul aparatului există un vid înaintat. Pentru mărirea contrastului, preparatele sînt supuse metalizării sub un anumit unghi, care face ca metalul să se depună în cantitate mai mare la nivelul detaliilor reliefate. Astfel, obiectele apar umbrite în direcția din care s-a făcut metalizarea.

Microscopul electronic, bazîndu-se pe dispersia electronilor de către obiecte cu densități diferite, nu poate diferenția detalii a căror densitate este apropiată. Acest lucru restrînge oarecum avantajele legate de marea lui putere de rezolvare.

Coloranţi şi metode de colorare

DR. VIORICA ANDREESCU

Examinarea celulelor, în stare proaspătă, la microscopul obişnuit, nedînd posibilitatea punerii în evidenţă a multor detalii de structură celulară, se recurge la metode de colorare.

Culoare şi coloranţi

Culoarea este senzaţia particulară, determinată de acţiunea radiaţiunilor spectrului vizibil asupra unui substrat sensitiv, special, de la nivelul ochiului. Spectrul vizibil este alcătuit din radiaţiuni electro-magnetice, cu o lungime de undă cuprinsă între 400—800 mµ, capabile să impresioneze nervul optic şi să producă astfel senzaţia de văz.

Culoarea apare în funcţie de lungimea de undă a luminii incidente; astfel radiaţiunile electromagnetice cu o lungime de undă de 640 mµ produc senzaţia de culoare roşie, iar cele cu o lungime de undă de 400 mµ senzaţia de culoare violet. Iluminarea uniformă de către întreaga serie a radiaţiunilor spectrului vizibil are ca rezultat senzaţia de lumină albă. Senzaţia de culoare se poate produce în două moduri:

a) prin acţiunea radiaţiunilor electromagnetice cu o anumită lungime de undă, în urma căreia rezultă culoarea spectrală sau pură, care nu poate fi descompusă cu mai multe componente — şi

b) prin acţiunea unui amestec de radiaţiuni, de diverse lungimi de undă; astfel, combinarea radiaţiunilor care dau culorile roşu şi verde poate determina senzaţia de culoare galbenă, iar combinarea radiaţiunilor corespunzătoare culorilor verde şi violet, senzaţia de culoare albastră.

Variaţiunile de nuanţă rezultă din faptul că trecerea de la sensibilitatea pentru radiaţiuni cu o anumită lungime de undă la radiaţiuni cu altă lungime de undă se face treptat, în timp ce scade sensibilitatea pentru o lungime de undă, creşte pentru altă lungime de undă.

Ochiul normal deosebeşte 130 nuanţe, dar nu are capacitatea de a diferenţia culorile spectrale, pure, de culorile rezultate din combinarea radiaţiunilor cu mai multe lungimi de undă.

Culoarea este în strînsă legătură cu proprietatea unor substraturi de a absorbi, din spectrul vizibil, radiaţiuni cu anumite lungimi de undă şi de a lăsa să treacă radiaţiuni cu alte lungimi de undă. Amestecul de radiaţiuni neabsorbite impresionează nervul optic, dînd senzaţia de culoare. Culoarea, astfel rezultată, este o *culoare complementară* culorii absorbite; combinarea radiaţiunilor absorbite cu cele complementare determină lumina albă.

Absorbţia completă a tuturor radiaţiunilor luminii incidente are ca rezultat senzaţia de culoare neagră, din lipsa radiaţiunilor capabile să impresioneze ochiul.

Se admite, în genere, că proprietatea de absorbţie selectivă, exercitată de unele corpuri asupra anumitor radiaţiuni de lumină, este determinată de constituţia chimică. Determinarea caracterului radiaţiunilor absorbite, prin „spectrometria absorbţiei", oferă posibilitatea identificării unor substraturi chimice; modificarea compoziţiei chimice este însoţită de schimbarea spectrului de absorbţie.

— Colorantul este un compus organic, colorat, care are calitatea de a colora diverse substraturi chimice, datorită capacităţii sale de a reacţiona chimic cu substratul pe care îl colorează sau de a fi absorbit sau dizolvat de substratul respectiv.

Caracterele substanţei colorante sînt determinate de prezenţa unor grupări chimice caracteristice: cromoforii şi auxocromii.

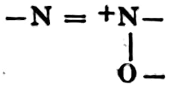
— *Cromoforii* sau *purtătorii de culoare* sînt grupări structurale, cu caracter nesaturat, care imprimă culoarea moleculei colorantului.

Se cunosc numeroase grupări cromoforice:

azo : $-N=N-$

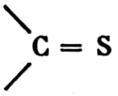
nitrozo : $-N=O$

azoxi :

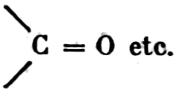


$$-N=\overset{+}{N}-\;\;(\text{N}-O^-)$$

thio :



carbonil :



Substanţele care conţin cromofori se numesc cromogene; acestea pot fi colorate dar nu colorante.

— *Auxocromii* sînt grupări structurale, cu caracter nesaturat, care nu produc culoare însă intensifică culoarea, mărind efectele grupărilor cromoforice şi imprimînd substanţei respective proprietatea de a transmite culoarea sa şi altor corpuri. Prezenţa grupării auxocromice în molecula unei substanţe cromogene, conferă acestei substanţe proprietăţi colorante.

Grupări auxocromice pot fi:

— diverşi radicali: $-OH$, $-SH$, $-NH_2$, $-NOH$, $-COOH$ şi
— elemente libere ca: Br, I, Cl.

Clasificarea coloranţilor

Se deosebesc două grupuri de coloranţi:

A. **Coloranţi naturali,** extraşi din produse animale sau vegetale (carminul, hematoxilina, orceina etc.).

B. **Coloranţi artificiali sau sintetici** derivaţi din diverse hidrocarburi extrase din gudroane; aceştia sînt, în genere, săruri de sodiu sau potasiu, astfel:

1. *Coloranţii bazici* sînt săruri rezultate din combinarea unei baze colorate cu un acid incolor: albastru de metilen este un clorhidrat de tetrametiltionină, rezultat din combinarea unei baze colorate: tetrametiltionina cu acidul clorhidric.

2. *Coloranţii acizi* sînt săruri rezultate din combinarea unui acid colorat cu o bază incoloră: eozina este un eozinat de potasiu sau de sodiu, format din combinarea unui acid colorat: acidul eozinic, cu o bază incoloră: hidratul de sodiu sau potasiu.

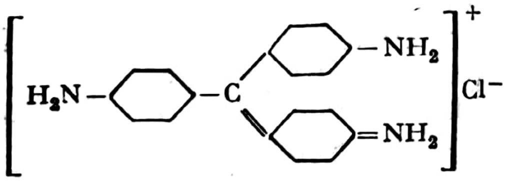
3. *Coloranţii neutri* sînt săruri rezultate din combinarea unui acid colorat cu o bază colorată; din acest grup fac parte o serie de coloranţi folosiţi frecvent în hematologie: eozinaţii de albastru de metilen şi de azur de metilen.

4. *Coloranţii indiferenţi*: Sudan III, Ecarlat R — nu sînt nici baze, nici acizi şi nu posedă grupări capabile de a forma săruri.

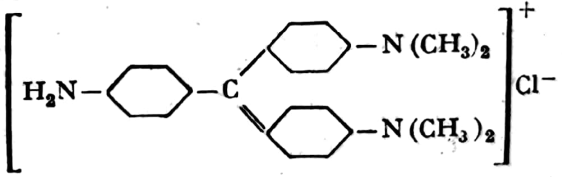
Coloranţii artificiali sau sintetici sînt, frecvent, folosiţi pentru colorarea ţesuturilor şi a bacteriilor.

Rozanilinele, coloranţi artificiali, din grupul fenilmetanelor, prezintă o deosebită importanţă, deoarece au o largă utilizare în tehnicile de colorare a bacteriilor; din grupul rozanilinelor fac parte: fucsina bazică, fucsina acidă, violetul de genţiana, violetul de metil, cristal violetul, verdele de malachit etc.

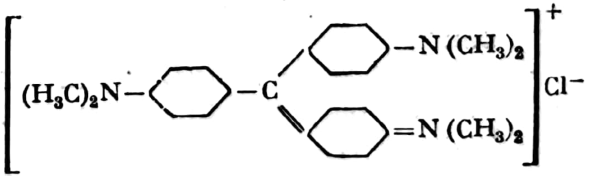
— *fucsina bazică*
(clorură de pararozanilină)



— *violetul de genţiana*
(clorură de tetrametil-pararozanilină)



— *cristalul violet*
(clorură de hexametil-pararozanilină)



Mecanismul proceselor de colorare

Mecanismul proceselor de colorare a fost explicat în diverse moduri: unii autori (Ehrlich, Meyer, Giemsa) au susţinut că la baza proceselor de colorare stau o serie de reacţii chimice, iar alţii (Fischer) au considerat colorarea rezultatul unor procese fizice.

În prezent, se admite că forțele răspunzătoare de mecanismul colorării substratelor biologice, atît în procesele fizice, cît și în cele chimice, sînt reprezentate de forțe electrice care acționează la nivel molecular, interesînd stratul extern de electroni ai atomilor participanți.

Procesul de colorare ar fi posibil prin unul din următoarele mecanisme :

1) Colorantul absorbit și menținut la suprafața substratului (prin forțe van der Waal's, interacțiuni culombice) se combină apoi, chimic, cu substratul pe care îl colorează. Reacțiile chimice ce ar avea loc în procesul de colorare, nu implică legături chimice puternice între colorant și substrat, încît spălarea prelungită a celulelor colorate poate duce la înlăturarea colorantului. Aceste slabe legături chimice sînt, în genere, îndeplinite de hidrogen.

2) Suprafețele substratelor, încărcate cu electricitate, atrag ionii de sarcină opusă, din soluțiile colorante, înconjurîndu-se de un alt înveliș ionic; această schimbare a învelișului ionic ar avea ca efect colorarea.

3) Colorantul se combină chimic cu ionii de sarcină opusă ai substratului, formînd o sare insolubilă în colorant și în substrat, pentru a rezista spălării.

Mecanismul ce stă la baza procesului de colorare nu a primit încă o explicație satisfăcătoare.

Factorii care influențează procesul de colorare

Colorarea este influențată de mai mulți factori : fixare, natura substratului, pH etc.

a) *Fixarea* se practică, înaintea colorării, supunînd substratul de colorat acțiunii unor agenți fizici sau chimici.

Fixarea bacteriilor se realizează, în mod obișnuit, trecînd frotiul, după uscare, de 2—3 ori, prin flacăra unui bec Bunsen.

Fixarea cu ajutorul agenților chimici — alcool, acizi, săruri de metale grele, agenți oxidanți etc. — este rar folosită în practica microbiologică.

Scopul fixării este de :

— a face să adere substratul de lamă ;

— a păstra și preciza structurile celulare și a mări vizibilitatea lor ;

— a mări permeabilitatea peretelui celular pentru colorant, prin omorîrea celulelor; omorîrea bacteriilor prezintă avantajul înlăturării pericolului de infectare, în cazul germenilor patogeni.

Agenții fixatori acționează prin denaturarea proteinelor și solidificarea structurilor celulare; prin desfășurarea proteinelor, cu expunerea grupărilor lor reactive : carbonil, amino, sulfhidril, se mărește afinitatea pentru colorant.

b) *Natura substratului*, organizarea și dispersiunea fizică a constituenților săi celulari, precum și constituția chimică a acestora influențează procesul de colorare.

c) *pH-ul*, existent în timpul procesului de colorare, determină selectivitatea coloranților pentru anumite structuri celulare; coloranții bazici sînt mai eficienți în mediu alcalin, iar cei acizi în mediul acid.

d) *Impuritățile* din substanțele colorante, în funcție de natura și cantitatea lor, acționează în procesul de colorare; prezența impurităților în fucsina bazică, utilizată în colorația Ziehl-Neelsen, favorizează formarea de artefacte.

Intensificatorii de culoare și mordanții

Intensificatorii sau accentuatorii de culoare se adaugă agentului colorant, în scopul de a mări intensitatea de colorare.

Funcția de intensificatori de culoare poate fi îndeplinită de agenți fizici și chimici; dintre agenții fizici, căldura este un bun intensificator de culoare, iar dintre cei chimici : acidul oxalic, acidul acetic, fenolul, hidratul de potasiu, formolul etc.

Unii intensificatori de culoare au și rol fixator.

Intensificatorii de culoare se deosebesc de mordanți prin faptul că ei acționează fără să se combine cu colorantul.

Mordanții sînt substanțe chimice care au proprietatea de a mări afinitatea și selectivitatea substanțelor colorante pentru anumite substraturi, iar uneori, de a face colorabile elemente necolorabile. Mordanții, avînd o mare afinitate, atît pentru colorant, cît și pentru substrat, joacă rolul de intermediar între aceste două elemente care nu au nici o afinitate unul față de altul, contribuind la fixarea puternică a colorantului pe substrat. Se cunosc două feluri de mordanți :

1) Mordanți bazici — alaun, sulfat de fier, tartrat de antimoniu — care acționează cu coloranții acizi.

2) Mordanți acizi — acid tanic, acid picric — care acționează cu coloranții bazici.

Metacromazia

Proprietatea unor substanțe colorante de a vira culoarea în contact cu anumite substraturi se numește metacromazie, iar substanțele colorante care prezintă această proprietate se numesc metacromatice.

Schimbarea de culoare s-ar datora prezenței unor elemente capabile să afecteze starea de dispersiune și de concentrație a colorantului metacromatic, ceea ce ar determina modificarea spectrului de absorbție a luminii incidente.

Acizii nucleici, metafosfații complecși, agarul etc. modifică spectrul de absorbție al coloranților metacromatici. Culoarea normală a coloranților metacromatici este albastră sau violetă, iar cea metacromatică este roșie.

Metode de colorare

Colorarea celulelor, în vederea studierii caracterelor morfologice, se practică :

a) pe celule vii și

b) pe celule omorîte, prin fixare.

a) — *Colorarea supravitală* se realizează prin aplicarea colorantului pe celule vii, nefixate; aceste celule sînt omorîte sub acțiunea colorantului.

Prin această metodă de colorare, se pun în evidență o serie de detalii structurale, invizibile la celulele omorîte prin fixare sau moarte.

Verdele Janus este cel mai bun colorant supravital.

Colorarea vitală sau intravitală constă în fixarea unor coloranți particulați sau coloidali de către celulele vii.

Colorarea vitală a bacteriilor nu se poate face decît cu coloranţi solubili, cu dispersie moleculară mare, deoarece particolele mari de colorant nu pot pătrunde în bacteriile vii.

Colorarea vitală permite cercetarea permeabilităţii membranei celulare, determinarea pH-ului, a potenţialului de oxido-reducere a protoplasmei vii etc.

Această coloraţie este netoxică pentru celule.

b) Colorarea bacteriilor şi a tuturor elementelor celulare se practică, în genere, după o prealabilă fixare.

În funcţie de metoda utilizată, se deosebesc:

1. a) *Coloraţii directe*: substratul se introduce, direct, în soluţia colorantă.

b) *Coloraţii indirecte* sau *prin mordansare*: substratul se tratează, în prealabil, cu un mordant, colorantul nefiind capabil de a acţiona direct.

2. a) *Coloraţii simple*: substratul este supus acţiunii unui singur colorant, acid sau bazic.

b) *Coloraţii combinate*: substratul este supus acţiunii mai multor coloranţi, în mod succesiv sau simultan; fiecare colorant acţionează independent, fixîndu-se electiv, pe diverse elemente.

Coloraţii uzuale în microbiologie

Bacteriile au mare afinitate pentru coloranţii bazici, în special pentru cei din grupul fenilmetanelor. Bacteriile, asupra cărora a acţionat substanţa colorantă, apar colorate uniform, datorită afinităţii egale a tuturor componentelor citoplasmatice pentru coloranţii bazici.

Coloraţia cu albastru de metilen. Frotiurile uscate şi fixate prin căldură se tratează în felul următor:

1. Se acoperă frotiul cu soluţia colorantă, timp de 1—2 minute.
2. Se înlătură colorantul şi se spală frotiul cu apă de robinet.
3. Se usucă şi examinează la microscop, cu imersia.

Colorantul se fixează pe germeni, încît aceştia apar coloraţi în albastru.

Coloraţia Gram. Coloraţia Gram descrisă de Gram în 1887 este metoda de colorare folosită, cel mai frecvent, în microbiologie.

Tehnica: frotiurile uscate şi fixate la flacără, se tratează în felul următor:

1. Se acoperă frotiul cu soluţie de violet de genţiana, timp de 1—2 minute.
2. Se înlătură colorantul şi se acoperă frotiul cu soluţia Lugol, timp de 2 minute.
3. Se înlătură soluţia Lugol şi se decolorează frotiul cu alcool-acetonă, pînă cînd soluţia decolorantă rămîne incoloră.
4. Se spală frotiul cu apă de robinet, pentru a îndepărta decolorantul.
5. Se acoperă frotiul cu soluţie de fucsină diluată 1/10 extemporaneu; soluţia de fucsină se menţine 30 de secunde, pînă la un minut.
6. Se spală frotiul cu apă de robinet, se usucă şi se examinează la microscop cu imersia.

Coloraţia Gram permite diferenţierea bacteriilor în specii gram pozitive şi gram negative; această diferenţiere este posibilă prin aplicarea unei coloraţii de contrast. Bacteriile gram pozitive nefiind influenţate de acțiunea decolorantului apar colorate în violet, pe cînd cele gram negative, pierzînd culoarea violetă în cursul decolorării, apar colorate în roșu; pe lîngă bacteriile gram pozitive și gram negative, există un număr de specii bacteriene care fixează în mod variabil colorantul Gram.

Capacitatea celulelor de a se colora gram pozitiv este destul de rară; schizomicetele, ascosporii și celulele vegetative ale levurilor se colorează totdeauna gram pozitiv, în timp ce sporii și granulele din miceliile unor fungi se colorează, numai uneori, gram pozitiv.

Celulele plantelor superioare și ale animalelor se colorează totdeauna gram negativ.

Mecanismul colorației Gram nu este încă elucidat; în vederea explicării sale s-au emis mai multe teorii.

1. Teoria permeabilității diferențiale a peretelui celular susține că în timp ce peretele celular atît al bacteriilor gram pozitive, cît și al celor gram negative, este permeabil pentru violet și Lugol, peretele celular al bacteriilor gram-pozitive este impermeabil pentru complexul coloidal, cu greutate moleculară mare, format după adăugarea mordantului iodat la colorantul bazic, încît acesta nu se mai poate dizolva în alcool și bacteria rămîne colorată în violet. Membrana celulară a bacteriilor gram negative, fiind mai permeabilă, permite pătrunderea alcoolului în celulă; complexul mordant + colorant se desface, trece în afara celulei iar bacteria se decolorează.

2. Teoria chimică coloidală se bazează pe corelația dintre punctul izoelectric al protoplasmei celulare și afinitatea sa pentru coloranții bazici. Această teorie susține că scăderea punctului izoelectric al materialului celular ar mări afinitatea sa pentru coloranții bazici; bacteriile gram pozitive, al căror punct izoelectric este mai scăzut (pH = 2) decît al celor gram negative (pH = 5), prezintă o afinitate mai mare față de coloranții bazici, deoarece cationii de colorant atrași de sarcinile electronegative ale bacteriilor, sînt puternic absorbiți la suprafața lor.

3. Teoria morfologică susține că protoplasma tuturor speciilor bacteriene este gram negativă. Caracterul gram pozitiv al unor specii bacteriene ar fi datorit prezenței la suprafața celulei a unui înveliș care are calitatea de a reține colorantul; acest înveliș este constituit din ribonucleat de magneziu, în combinație cu polizaharizii peretelui celular.

S-a obținut, în mod experimental, transformarea bacteriilor gram-pozitive în bacterii gram negative prin îndepărtarea ribonucleatului de magneziu din bacteriile gram pozitive, supuse acțiunii ribonucleazei sau acțiunii sărurilor biliare (colat de sodiu). În continuare s-a reușit redobîndirea gram pozitivității prin cultivarea acestor celule bacteriene în medii de cultură cu ribonucleat de magneziu 1%, cu condiția menținerii în structura celulei, probabil la nivelul peretelui celular, a polizaharizilor indispensabili fixării ribonucleatului de magneziu.

În unele cazuri, de exemplu la bacteriile tratate cu lizozim, recăpătarea Gram-pozitivității nu mai este posibilă după tratare cu ribonucleat de magneziu.

P = V
N = R

Dovezi experimentale sprijină teoriile care localizează substratul biologic celular, răspunzător de afinitatea selectivă specifică a speciilor bacteriene pentru colorația Gram la nivelul peretelui celular. Bacteriile gram-pozitive și levurile pierd gram-pozitivitatea în urma distrugerii peretelui celular, în cursul procesului normal de autoliză sau a aplicării la suprafață a unor agenți activi sau enzime specifice (nucleoze). Caracterul gram-negativ al protoplaștilor precum și constatarea că germenii gram-negativi, derivați din germeni gram-pozitivi, sînt de dimensiuni mai mici decît omologii lor gram-pozitivi, atestă, de asemenea, rolul peretelui celular în fixarea colorantului. Totuși, nu se poate da un răspuns precis asupra existenții și naturii unui substrat chimic specific, răspunzător de colorația Gram. Faptul că alterarea integrității celulare a unor bacterii gram-pozitive atrage pierderea gram-pozitivității, face să se presupună că răspunsul celulelor, la colorația Gram, ar ține, mai curînd, de o organizare morfologică specială a suprafețelor celulare, decît de existența unui substrat chimic specific. S-a dovedit că o proteină păstra caracterul gram-pozitiv atît timp, cît era intactă ; în momentul producerii unor fisuri, la suprafața sa, pierdea acest caracter.

Existența speciilor bacteriene gram-variabile este în funcție, fie de condițiile tehnice ale executării metodei de colorare — decolorarea prelungită precum și nerespectarea pH-ului alcalin, în momentul adăugării colorantului primar, pot modifica rezultatul — fie în funcție de condițiile biologice ale celulei bacteriene ; afinitatea pentru colorația Gram poate fi influențată, în unele cazuri, de vîrsta culturilor.

Între germenii gram-pozitivi și gram-negativi, mai sînt și alte deosebiri, în afara răspunsului diferit față de colorația Gram (tabel I).

Tabelul I

Diferența între germenii gram-pozitivi și gram-negativi
(după Lamanna)

	Germeni gram-pozitivi	Germeni gram-negativi
Grosimea peretelui celular	mai mare	mai mică
Peretele celular rupt prin căldură	nu	da
Hexozamine conținute în peretele celular	mai numeroase	mai puțin numeroase
Conținut în magneziu	mai mare	mai scăzut
Punctul izoelectric apărut la colorare	pH = 2–3	pH = 4–5
Cantitatea de colorant reținută la punctul izoelectric apărut	mai mare	mai mică
Efectul bacteriostatic al coloranților trifenil metanici	foarte sensibili	mai rezistenți
Permeabilitatea pentru colorant în stare vie	mai permeabil	slab permeabil
Autoliza	rară	mai frecventă
Natura toxinelor produse	exotoxine	endotoxin și antigene de tip Boivin
Sensibilitate la penicilină	mai mare	mai mică
Acidorezistența	anumite specii	nici o specie

Colorația Ziehl-Neelsen. Colorația Ziehl-Neelsen se aplică pentru colorarea germenilor acidorezistenți.

Tehnica. Frotiurile, uscate și fixate la flacără, se tratează în felul următor :

1. Se acoperă frotiul cu fucsină fenicată Ziehl, care se menține 10 minute ; în acest timp se încălzește lama dedesubt, cu flacăra unui bec

Bunsen, de 2—3 ori, pînă cînd ies vapori; se va evita încălzirea pînă la fierberea colorantului pe lamă.

2. Se îndepărtează colorantul şi se spală cu apă de robinet.

3. Se decolorează frotiul cu una din următoarele soluţii decolorante: acid azotic diluat 1/3 sau acid sulfuric diluat 1/4.

4. Se spală frotiul cu apă de robinet, pentru a îndepărta soluţia decolorantă.

5. Se decolorează frotiul cu alcool 96°.

6. Se spală frotiul cu apă de robinet, pentru a îndepărta decolorantul.

7. Se acoperă frotiul cu soluţie de albastru de metilen, timp de 1 minut.

8. Se spală frotiul cu apă de robinet, se usucă şi se examinează la microscop cu imersie.

Germenii acidorezistenţi apar coloraţi în roşu, în timp ce celelalte elemente celulare apar colorate în albastru deoarece spre deosebire de alte specii bacteriene, după contactul cu colorantul primar, nu se decolorează prin tratare cu acizi puternici.

Acidorezistenţa constituie o proprietate caracteristică a germenilor din grupul *Mycobacterium*, a cîtorva specii de actinomicete iar, în anumite condiţii, şi a unor specii de *Corynebacterium*. Sporii bacterieni şi ascosporii unor levuri sînt, totdeauna, acidorezistenţi.

Substratul chimic răspunzător de acidorezistenţa micobacteriilor este diferit de cel al celorlalte specii acidorezistente.

Acidorezistenţa micobacteriilor ar fi datorită unor constituenţi celulari ca acizi graşi, alcooli şi carbohidraţi, prezenţi în celula bacteriană. Dintre aceşti constituenţi celulari, un rol preponderent în imprimarea caracterului de acidorezistenţă se atribuie acidului micolic, care se află legat cu un carbohidrat, în celula germenilor acidorezistenţi. S-a obţinut, în mod experimental, pierderea acidorezistenţei prin îndepărtarea din celula bacteriană a compuşilor conţinînd acid micolic; adăugarea de acid micolic la un substrat celular lipsit de acidorezistenţă, a fost urmată de apariţia acestui caracter.

Acidorezistenţa micobacteriilor pare a fi strîns legată de integritatea structurală a peretelui celular, care are proprietatea de a proteja concentraţia şi distribuirea substratului material cu proprietăţi acidorezistente. Simpla agitare a unei suspensii bacteriene sau întinderea pe lamă poate distruge acidorezistenţa, prin alterarea peretelui celular.

Lamanna consideră acidorezistenţa anumitor specii bacteriene, o proprietate caracteristică conferită de existenţa unui substrat celular, constituit din complexe lipidice, în care substanţa colorantă şi fenolul au o capacitate de solubilizare mai mare decît în decolorant. Această proprietate a substratului celular permite retenţia maximă a colorantului în germenii acidorezistenţi.

Coloraţii speciale în microbiologie

Colorarea detaliilor de structură a celulelor bacteriene se face prin metode speciale care pun în evidenţă un anumit caracter morfologic: cilii, sporul, capsula etc.

Metode de colorare pentru punerea în evidenţă a cililor bacterieni

Metoda Zettnow: 1. Se prepară o suspensie bacteriană omogenă şi uşor opalescentă în apă distilată: suspensia de germeni aerobi se obţine din culturi pe medii solide, iar cea din germeni anaerobi, din culturi în medii lichide.

2. Se pregătesc frotiuri prin depunerea a 2—3 picături de suspensie bacteriană, cu ajutorul unei pipete Pasteur, cu vîrful subţiat, pe suprafaţa unor lamele degresate în prealabil, şi flambate în momentul folosirii.

3. Se lasă frotiurile să se usuce sub un capac de sticlă.

4. Se fixează frotiul, după uscare, prin menţinere în formol diluat 1/10, timp de 10 minute.

5. Se trece frotiul din formol în apă distilată 3 minute (lamelele se pun, totdeauna, cu frotiul în jos).

6. Se introduce frotiul în mordant: soluţie de tanin şi de tartrat dublu de stibiu şi potasiu, încălzită la 60—70°, în care se menţine timp de 10 minute; soluţia mordantă, clară la început, răcindu-se, în cursul celor 10 minute de mordansare, devine opalescentă.

Fixarea, spălarea şi mordansarea se practică în sticle de ceasornic.

7. Se scoate frotiul din mordant, cu ajutorul unei pense, şi se spală cu apă distilată.

8. Se acoperă frotiul cu soluţie de sulfat de argint + amoniac, preparată extemporaneu, încălzindu-se uşor la flacăra unui bec Bunsen; colorantul se menţine timp de 30—60 de secunde, completîndu-se între timp cantitatea care se evaporă în cursul încălzirii.

9. Se spală frotiul cu apă distilată, se usucă şi se montează cu ulei de cedru, aplicîndu-se cu faţa în jos, pe lame bine spălate.

Prepararea mordantului. Se prepară două soluţii:

— soluţie de tartrat dublu de stibiu şi potasiu 1/15.

— soluţie de tanin 5%.

Se amestecă cele 2 soluţii adăugîndu-se soluţia de tartrat dublu de stibiu şi potasiu, picătură cu picătură, la soluţia de tanin, încălzită la 40°, pînă cînd se formează un precipitat care nu se mai dizolvă prin agitare, soluţia căpătînd un aspect opalescent.

Mordantul trebuie să fie opalescent la rece şi limpede la temperatura de 60°; dacă nu se clarifică la temperatura de 60°, se mai adaugă tanin, la cald.

Prepararea colorantului. Se prepară 2 soluţii:

Soluţia I	sulfat de sodiu	3 g
	apă distilată	15 ml
Soluţia II	nitrat de argint	3 g
	apă distilată	15 ml

Se amestecă cele două soluţii, obţinîndu-se un precipitat alb de sulfat de argint, care se lasă să se depună; după sedimentarea precipitatului, se decantează supernatantul şi se înlocuieşte cu aceeaşi cantitate de apă bidistilată; se repetă de trei ori operaţia de spălare a precipitatului. Final, se reia precipitatul de sulfat de argint în 250 ml apă bidistilată, obţinîndu-se o soluţie saturată, care se păstrează într-o sticlă colorată.

În momentul folosirii, soluţia de sulfat de argint, diluată cu o cantitate egală de apă bidistilată, se amestecă cu o soluţie de amoniac diluat 1/3, adăugată, picătură cu picătură. După adăugarea primei picături de amoniac apare o uşoară opalescenţă a soluţiei, datorită formării unui precipitat, care se dizolvă ulterior în excesul de amoniac realizat prin adăugarea în continuare a 2—3 picături de soluţie de amoniac (de obicei, la 10 ml soluţie de sulfat de argint, diluată 1/2, se adaugă 3 picături de soluţie de amoniac 1/3). În cele din urmă, se adaugă în colorant o picătură de sulfat de argint; dacă amoniacul nu se găseşte în cantitate prea mare, se formează un nor albăstrui, care cade la fund, dizolvîndu-se cu greutate.

Metoda Casares Gill. Colorarea se face prin impregnarea argentică sau cu fucsină Ziehl.

I. Frotiurile uscate şi nefixate se tratează în felul următor:

1. Se acoperă frotiul cu mordantul Casares Gill, filtrat; se lasă să acţioneze mordantul timp de 2 minute; în acest timp se formează la suprafaţa lichidului o peliculă cu reflexe metalice.

2. Se spală frotiul mai întîi cu o cantitate mare de apă de robinet, apoi cu apă distilată.

3. Se acoperă frotiul cu soluţia Fontana, încălzind uşor lama, pînă la emiterea de vapori, cu ajutorul flăcării unui bec Bunsen; impregnarea argentică se face timp de 20—30 de secunde.

4. Se spală frotiul cu apă de robinet, se usucă şi se montează cu balsam.

II. Colorarea cu fucsină fenicată Ziehl se practică după tratarea frotiului cu mordantul Casares Gill timp de 2 minute şi spălarea frotiului cu apă de robinet; fucsina, nediluată, se menţine pe preparat timp de 1 minut.

După colorare, se spală frotiul cu apă de robinet, se usucă şi se examinează la microscop, cu imersia.

Prepararea mordantului Casares Gill. Se prepară 2 soluţii:

Soluţia I: se triturează într-un mojar:

Tanin	10 g
Clorură de aluminiu hidratată	18 g
Alcool de 70°	30 ml

Soluţia II: se triturează într-un mojar:

Clorură de zinc	10 g
Fuscină bazică	1,5 g
Apă distilată	10 ml

Se amestecă cele două soluţii, adăugîndu-se picătură cu picătură, soluţia II în soluţia I.

Mordantul se păstrează la întuneric; în momentul folosirii se diluează cu apă distilată:

Mordant	1 parte
Apă distilată	4 părţi

Prepararea soluţiei Fontana. Se prepară o soluţie de nitrat de argint 2%, căreia i se adugă picătură cu picătură, soluţie de amoniac 1/3, pînă cînd soluţia colorantă mai păstrează o uşoară opalescenţă.

Metode de colorare pentru punerea în evidenţă a capsului bacteriene

Metoda Burri: 1. se pune pe lamă o picătură de suspensie bacteriană, care se amestecă cu o picătură de tuş de China;

2. se întinde frotiul cu ajutorul unei lame;

3. se lasă să se usuce şi se examinează la microscop, cu imersia.

Bacteriile apar incolore pe fondul negru al preparatului. Unii autori recomandă colorarea finală a frotiului cu fucsină Ziehl, diluată 1/10, timp de 4 minute; în acest caz, pe un fond negru, germenii apar coloraţi în roşu, cu o zonă incoloră în jur, care corespunde capsulei.

Metoda Ziehl-Neelsen modificată. Frotiurile uscate şi fixate la flacără se tratează în felul următor:

1. se colorează frotiul cu fucsină fenicată, timp de 2 minute, la cald;
2. se spală frotiul cu apă de robinet;
3. se tratează frotiul cu mordantul Muir, timp de 1 minut;
4. se spală frotiul cu apă de robinet;
5. se decolorează frotiul cu alcool metilic;
6. se recolorează frotiul cu albastru de metilen, timp de 1 minut;
7. se spală frotiul cu apă de robinet, se usucă şi se examinează la microscop, cu imersia.

Capsula apare colorată în albastru, iar germenii apar coloraţi în roşu.

Prepararea mordantului Muir:

Soluţie saturată de sublimat	2 ml
Soluţie saturată de alaun de potasiu	5 ml
Soluţie de tanin 20%	2 ml.

Metode de colorare pentru punerea în evidenţă a sporilor

Metoda Gray modificată. Frotiurile uscate şi fixate la flacără se tratează în felul următor:

1. se acoperă frotiul cu soluţie apoasă de verde de malahit 5%;
2. se încălzeşte lama, de 3 ori, cu flacăra unui bec Bunsen, pînă la emiterea de vapori după fiecare încălzire, se înlătură soluţia colorantă de pe lamă şi se înlocuieşte cu soluţie colorantă care n-a fost supusă acţiunii căldurii;
3. se spală frotiul cu apă;
4. se acoperă frotiul cu soluţie de fucsină, diluată 1/10, timp de 1—2 minute;
5. se spală frotiul cu apă, se usucă şi se examinează la microscop, cu imersia.

Sporii apar coloraţi în verde-albăstrui, iar corpul microbian apare violaceu.

Metoda Ziehl-Neelsen modificată. Frotiurile uscate şi fixate la flacără se tratează în felul următor:

1. se acoperă frotiul cu fucsină fenicată Ziehl, 10 minute; în acest timp, se încălzeşte lama de 3 ori, cu flacăra unui bec Bunsen, pînă la emiterea de vapori;
2. se lasă să se răcească frotiul, apoi se repetă operaţia de colorare cu fucsină la cald;
3. se îndepărtează colorantul şi se spală frotiul cu apă;
4. se decolorează frotiul cu soluţie apoasă de acid sulfuric 3—5%;
5. se spală frotiul cu apă;

6. se recolorează cu albastru de metilen, timp de 1 minut;
7. se spală frotiul cu apă, se usucă şi se examinează la microscop cu imersia.

Sporul apare colorat în roşu, iar bacteria în albastru.

Prepararea soluţiilor colorate

În microbiologie, coloranţii se folosesc sub formă de soluţii apoase, deoarece germenii se colorează numai după dizolvarea colorantului în apă; în genere, se adaugă acestor soluţii o cantitate mică de fenol care, pe lîngă proprietatea sa de a împiedica poluarea colorantului cu microorganisme, are şi un rol de mordant.

Metodele de preparare a soluţiilor colorante, folosite în practica microbiologică

Albastru de metilen:

Albastru de metilen (cristale)	1 g
Fenol lichefiat	2 ml
Alcool 96°	10 ml
Apă distilată	100 ml

Se triturează într-un mojar colorantul cu alcoolul; după adăugarea fenolului, se adaugă o parte din apa distilată şi se decantează soluţia colorantă într-un flacon; se spală mojarul cu restul de apă distilată, care se adaugă apoi colorantului din flacon.

Soluţia de colorant astfel preparată se filtrează prin hîrtie de filtru, după menţinere, timp de 24 de ore, la 37°.

Albastru de toluidină:

Albastru de toluidină	1 g
Fenol lichefiat	2 ml
Alcool 96°	10 ml
Apă distilată	100 ml

Metoda de preparare este cea descrisă pentru prepararea soluţiei de albastru de metilen. Colorantul posedă proprietăţi metacromatice.

Violetul de genţiana:

Violet de genţiana (pulbere)	1 g
Fenol lichefiat	2 ml
Alcool 96°	10 ml
Apă distilată	100 ml

Metoda de preparare este cea descrisă pentru prepararea soluţiei de albastru de metilen.

Fucsina:

Fucsină bazică	1 g
Fenol lichefiat	5 ml
Alcool 96°	10 ml
Apă distilată	100 ml

Metoda de preparare este cea descrisă pentru prepararea soluţiei de albastru de metilen.

Coloranţii nu se păstrează, timp îndelungat, sub forma de soluţii apoase. De aceea, în laboratoarele în care se folosesc cantităţi mici de coloranţi se recomandă prepararea, mai întîi, de soluţii saturate alcoolice, din care se prepară ulterior, cantitatea necesară de soluţie apoasă.

Prepararea soluţiei saturate alcoolice sau a soluţiei-mamă de colorant. Într-un flacon cu dop de sticlă, bine spălat şi uscat, se pune o cantitate de alcool, căreia i se adaugă substanţa colorantă, pînă se obţine o soluţie saturată; substanţa colorantă nesaturată sedimentează pe fundul flaconului.

Soluţiile saturate se obţin, în genere, prin adăugarea a 10—15 g substanţă colorantă la 100 ml alcool de 96°; soluţia saturată de violet de genţiana se obţine prin adăugarea a 6—8 g de substanţă colorantă la 100 ml alcool de 96°.

Soluţiile alcoolice, după preparare, se menţin 48 de ore la 37°, agitîndu-se din cînd în cînd.

Prepararea soluţiilor apoase se face prin diluarea soluţiei saturate alcoolice, în proporţie de 1/10, cu apă fenolată 2—3%.

Metodele de colorare, folosite frecvent în microbiologie, necesită, pe lîngă soluţiile colorante, şi o serie de soluţii cu acţiune mordantă sau cu acţiune decolorantă asupra unor specii bacteriene.

Prepararea soluţiei Lugol (mordant):

Iod	1 g
Iodură de potasiu	2 g
Apă distilată	300 ml

Se dizolvă, într-un mojar, iodura de potasiu într-o cantitate mică de apă distilată; se triturează apoi iodul metalic în soluţia de iodură de potasiu; după dizolvarea iodului, se adaugă o parte din apa distilată în mojar; se decantează soluţia într-o sticlă brună, adăugîndu-se şi restul de apă distilată.

Prepararea soluţiei de alcool-acetonă:

Alcool de 96°	3 părţi
Acetonă	1 parte

Soluţiile colorante, atît cele alcoolice, cît şi cele apoase, se păstrează în flacoane cu dop de sticlă şi la întuneric.

Microscopia cu fluorescenţă în bacteriologia medicală

PROF. N. NESTORESCU, DR. AL. POPESCU, DR. COLETTE GEORGESCU

Observarea microscopică a fenomenului de fluorescenţă a preocupat pe diverşi cercetători încă de la începutul secolului nostru. Köhler, în 1904, face primele studii de microscopie prin observarea fluorescenţei primare a preparatelor biologice supuse radiaţiilor ultraviolete. Lehmann, în 1913, construieşte microscopul cu luminiscenţă, utilizînd condensatorul pentru fond întunecat. Microscopul lui Lehmann a fost ulterior îmbunătăţit de Ellinger şi Hirt (1929). Fluorescenţa proprie a microorganismelor şi celulelor nu este suficientă pentru examinarea microscopică. Emisiunea este slabă, iar diferenţierile nu sînt posibile. O importanţă mult mai mare în practica microscopiei cu fluorescenţă a căpătat-o aşa-numita fluorescenţă secundară sau indusă a microogranismelor. Prowazek în 1914, studiază luminiscenţa infuzorilor impregnaţi cu chinină. Bommer, în 1929, utilizează tripaflavina în observarea ţesuturilor şi celulelor. Haitinger, în 1938, pune la punct o serie de tehnici de fluorocromare care fac ca utilitatea microscopiei cu fluorescenţă în biologie să se dezvolte foarte mult. Găsirea de către Coons, în 1942, a posibilităţii de legare specifică a fluorocromilor prin intermediul anticorpilor, a deschis domeniul imunofluorescenţei, a cărei utilitate pentru identificarea microorganismelor se afirmă din ce în ce mai mult.

Fenomenul de fluorescenţă. Noţiuni de fizică. Fenomenul de luminiscenţă a fost explicat cu ajutorul teoriei cuantice a luminii, pe baza fenomenelor de absorbţie şi iradiere. Sub acţiunea unei radiaţii dintr-o sursă externă, atomii sau moleculele absorbind această radiaţie, trec din starea normală în stare excitată. Revenirea la starea normală se face cu emiterea sub formă de lumină a energiei de excitaţie absorbită. Emisiunea de lumină care este consecinţă a revenirii la starea normală, reprezintă fenomenul de luminiscenţă. Intervalul în care are loc oscilaţia între normal şi excitat, este marcat de două nivele de energie ale învelişurilor electronice ale atomului. În mod normal atomul se găseşte pe nivelul inferior de energie. Cînd, datorită unei perturbări energetice, atomul a trecut pe un nivel superior, revenirea la nivelul inferior se face cu emisiunea de energie radiantă. Dacă valoarea acestei emisiuni se plasează în spectrul vizibil, se va produce un efect luminos (fig. 27).

Invizibil	Vizibil							Invizibil
Ultraviolet	Violet 380-430 mμ	Albastru închis 430-460 mμ	Albastru 460-500 mμ	Verde 500-550 mμ	Galben 550-600 mμ	Portocaliu 600-660 mμ	Roşu 660-750 mμ	Infraroşu
120-380 mμ	380 - 750 mμ							750-2000 mμ

Fig. 27. — Spectrul luminii.

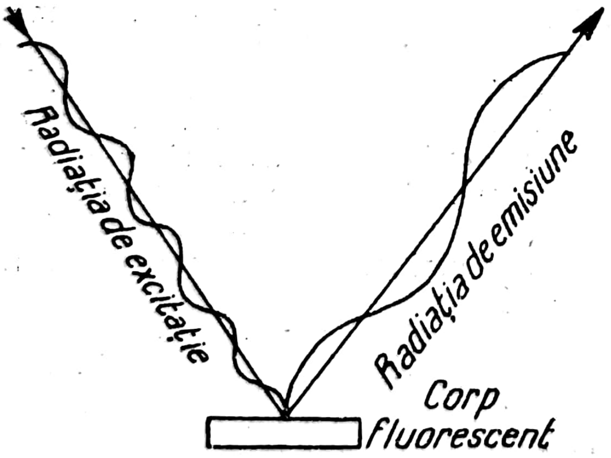


Fig. 28. — Frecvenţa radiaţiei de emisiune este mai mică decît a radiaţiei de excitaţie.

Emisiunea luminiscentă se deosebeşte de alte tipuri de emisiune luminoasă, printr-o serie de proprietăţi specifice arătate de S. I. Vavilov. Astfel, spre deosebire de lumina reflectată şi de lumina de difuzie, emisiunea de luminiscenţă are în general o altă lungime de undă decît radiaţia excitantă. Emisiunea de luminiscenţă nu dispare imediat după întreruperea acţiunii radiaţiei incidente. În sfîrşit, intensitatea luminii de luminiscenţă este mai mare decît a emisiunii unui corp absolut negru la aceeaşi temperatură cu a corpului luminiscent. Cu alte cuvinte, emisiunea luminiscentă are loc „la rece". În raport de durata de iluminare după încetarea acţiunii radiaţiei excitante, se deosebesc două cazuri particulare ale luminiscenţei : fluorescenţa şi fosforescenţa. Dacă tipul de iluminare ulterioară nu depăşeşte 10^{-9}—10^{-7} secunde, emisiunea luminoasă se numeşte fluorescenţă. Fenomenul de fluorescenţă este dat de luminiscenţa cu durata mai mare de 10^{-7} sec. Fenomenul de fluorescenţă şi în special tipul său particular fotofluorescenţa, prezintă un interes deosebit pentru utilizarea lui în microscopie. El poate fi observat cînd, sub acţiunea radiaţiei excitante, este emis de o cantitate infimă de substanţă fluorescentă. Excitarea fotofluorescenţei are loc pe seama absorbţiei de energie luminoasă. În acest caz, substanţele luminiscente acţionează ca transformatoare de lumină, deplasînd spectrul de emisie în sensul lungimilor de undă mai mari faţă de spectrul de absorbţie. Fenomenul corespunde legii stabilită de Stockes, conform căreia lumina de fluorescenţă se caracterizează printr-o lungime de undă mai mare decît lumina care a produs fluorescenţa (fig. 28). Potrivit aceleiaşi legi prin excitarea diferitelor substanţe cu radiaţii ultraviolete, acestea în raport de natura lor, vor emite lumină vizibilă cu diferite lungimi de undă (de diferite culori). O explicaţie a deplasării spectrului radiaţiilor emise prin fluorescenţă, faţă de radiaţia excitantă, este dată de faptul că o parte din energia absorbită se consumă în diferite procese intramoleculare şi o altă parte trece în căldură. Rezultă că energia radiaţiei emise va avea o valoare mai mică decît a radiaţiei incidente (pierderi stocksiene). Emisiunea de luminiscenţă, în afară de energia de excitaţie şi de natura substanţei luminiscente, este condiţionată şi de diferiţi factori externi: temperatură, pH, solventul substanţei luminiscente şi concentraţia acesteia în soluţie, prezenţa de substanţe străine etc.

Fluorocromii. Compuşii organici care emit lumină fluorescentă au fost numiţi fluorocromi. Capacitatea de a emite lumina fluorescentă o posedă un număr destul de restrîns de substanţe. În structura fluorocromilor dispunerea moleculelor joacă un rol important. Mulţi dintre fluorocromi sînt emiţători numai în soluţie. În această stare, un rol important îl joacă gradul de disociere a substanţei, deci concentraţia în ioni de hidrogen, care poate influenţa atît intensitatea cît şi poziţia spectrală a emisiunii fluorescente. Legat de concentraţia fluorocromului în soluţie, există un optim de emisiune care, la concentraţii mai mari, tinde să se stingă. Stingerea fenomenului de fluorescenţă se observă nu numai ca urmare a creşterii concentraţiei fluorocromului în soluţie, ci şi acţiunii unor alte substanţe cum sînt: oxigenul, halogenii, anilina, fenolul, rezorcina, nitrobenzolul, benzaldehida, unele metale (fierul, nichelul) şi altele. Substanţele cu acţiune stingătoare absorb energia atomilor excitaţi, utilizînd-o în procese de altă natură decît emiterea de fotoni luminoşi.

Fenomenul de fluorescenţă este decelabil la concentraţii infinitesimale de fluorocrom, astfel fluoresceina, solubilă în apă, poate fi pusă în evidenţă prin observarea fluorescenţei ei în diluţie de 10^{-13}. Această calitate face din analiza cu fluorescenţă una din cele mai sensibile metode de cercetare.

În practica bacteriologică, fluorocromarea directă a germenilor are o aplicabilitate destul de largă. Metoda a fost introdusă iniţial de Haitinger şi Hagemann. Fluorocromii utilizaţi pentru fluorocromarea bacteriilor aparţin unor grupe diferite de compuşi organici. În raport cu disocierea lor în soluţiile apoase, putem vorbi de fluorocromi alcalini, acizi şi neutri. Gradul util de disociere a moleculelor fluorocromilor alcalini se obţine în mediul slab acid (pH 6,3—6,5). În această stare, cationii care reprezintă componentul fluorescent al substanţei, dau emisiunea cea mai intensă de fluorescenţă. Din grupa fluorocromilor alcalini fac parte: auramina, acridin-orange, acridin-gelb, aurofosfina, coriofosfina, berberin-sulfatul, roşul neutru, tripaflavina. Componenta fluorescentă a fluorocromilor acizi o constituie anionii moleculelor lor disociate. Disocierea electrolitică cu emisiunea cea mai puternică a fluorescenţei, se obţine în mediu slab alcalin (pH 7,5—7,8). Din această grupă fac parte: fluoresceina, eozina, primulina, titan-gelb, eritrosina. Activitatea fluorescentă a fluorocromilor neutri este condiţionată de starea nedisociată a moleculei lor. Un astfel de fluorocrom este rodamina B.

Fluorocromarea bacteriilor este un proces fizico-chimic complex, condiţionat de pH-ul mediului, concentraţia fluorocromului, raportul dintre fluorocrom şi masa microbului etc. Pentru colorarea preparatelor, fluorocromii se folosesc dizolvaţi în apă distilată, ser fiziologic, soluţii tamponate la un anumit pH. Concentrațiile fluocromului în aceste soluții sînt mici, ele variind între 1/5 000 și 1 /100 000. Utilizarea soluțiilor mult diluate face posibilă fluorocromarea preparatelor nu numai după fixare, ci și intravital. În fluorocromarea preparatelor microscopice apare uneori necesitatea realizării unui contrast mai marcat între fond și detaliile fluorocromate. Acest contrast se poate obține prin utilizarea unor substanțe cu acțiune stingătoare a fluorescenței, fenomen menționat mai sus.

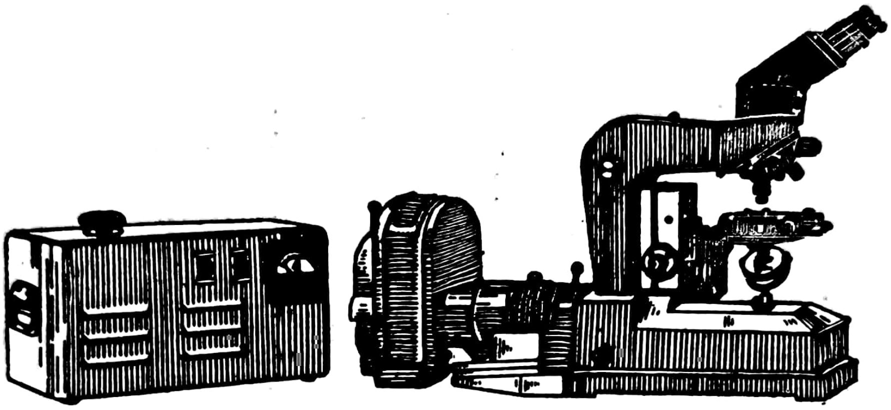


Fig. 29. — Microscopul cu fluorescență ML_2.

În calitate de stingători, se pot folosi soluții de albastru de metilen, albastru de anilină, fucsină acidă sau bazică, roșu de Congo, lugol, permanganat de potasiu și altele. Soluțiile cu acțiune stingătoare se utilizează fie simultan cu soluția de fluorocrom cu care se amestecă, fie prelucrînd cu ele suplimentar preparatele deja fluorocromate.

Pentru a evita reacțiile fotochimice la care sînt expuși fluorocromii în soluție sub acțiunea luminii, se recomandă păstrarea lor în flacoane de sticlă brună, la întuneric.

Instalația pentru microscopia cu fluorescență. În compunerea instalației pentru microscopia cu fluorescență intră : sursa de lumină, filtrele de lumină și microscopul (fig. 29).

a) *Sursa de lumină.* În microscopia cu fluorescență, obiectul de examinat nu reflectă lumina, ci o emite sub acțiunea unei radiații excitante. Vorbind de sursa de lumină a instalației, ne referim la sursa radiației de excitație reprezentată de lumina ultravioletă și de radiația cu lungime mică de undă din spectrul vizibil (violet-albastru). Valoarea emisiunii de lumină fluorescentă este foarte mică, ea reprezentînd abia 1% față de energia radiației de excitație. De aceea este nevoie ca pentru o observație clară, să se folosească surse puternice de radiații. La instalațiile moderne, sursa de excitație este dată de o lampă de cuarț tubulară sau sferică, cu vapori de mercur sub tensiune înaltă sau supraînaltă, cu valori între 50 și 1 000 wați. Sursele date de arcul electrozilor de cărbune sînt folosite din ce în ce mai puțin, fiind mult mai incomode. Lămpile cu mercur emit radiații abundente în domeniul ultraviolet apropiat și în spectrul vizibil violet-albastru, foarte convenabile pentru excitarea fluorocromilor. Intensitatea acestor lămpi este reglabilă, iar perioadele emisiunii sînt suficient de constante. Lampa se montează într-un dispozitiv prevăzut cu fante de ventilare pentru evitarea supraîncălzirii. De asemenea, poziţia lămpii poate fi reglată în vederea centrării. Curentul de alimentare este dat de o instalaţie specială.

b) *Filtrele de lumină*. Sursa de lumină emite radiaţii cu diferite lungimi de undă : ultraviolete, vizibile şi calorice. Pentru producerea fluorescenţei şi observarea comodă a acesteia, este nevoie ca celelalte radiaţii în afara celor de excitaţie, să fie oprite. În acest scop, pe traiectul razelor de la sursă la preparat, se interpun diferite filtre care, avînd rolul de a „purifica” fasciculul de excitaţie, au fost numite filtre de excitaţie. Ele se plasează în faţa lămpii, montîndu-se fie în carcasa acesteia, fie într-o casetă specială. Radiaţiile filtrate au un interval îngust în ce priveşte lungimea de undă, ele depinzînd de coeficientul de permeabilitate a filtrelor pe care le-a traversat. Există filtre de excitaţie ultraviolete (U. V.) care, absorbind radiaţiile cu lungime mare de undă (vizibile şi infraroşii), permit trecerea razelor ultraviolete invizibile din spectrul apropiat. Filtrele de excitare violete şi albastre închis permit trecerea razelor vizibile cu lungime de undă scurtă şi absorb aproape toate razele infraroşii şi razele din spectrul vizibil cu lungime de undă mare. Ele se folosesc pentru observarea fluorescenţei emise sub acţiunea luminii vizibile. Unele filtre de excitaţie permit trecerea radiaţiilor roşii şi infraroşii, care pot produce fenomenul de stingere calorică a luminiscenţei şi împiedică observarea acesteia în domeniul roşu. La asemenea filtre se combină filtre albastre-verzi din sticlă, avînd calitatea de protectoare calorice.

Pentru protejarea filtrelor împotriva încălzirii, majoritatea lămpilor sînt prevăzute cu o cuvă care se umple cu apă distilată sau cu o soluţie de sulfat de cupru 1—4%. Aceasta se aşază între sursă şi filtrele de excitaţie. În acelaşi scop se poate utiliza şi un filtru de sticlă BG12 de 3 mm grosime.

Pentru reţinerea radiaţiilor primare de excitaţie, care se asociază luminii fluorescente după traversarea preparatului, se folosesc filtrele protectoare de lumină. Acestea se plasează între preparat şi ochiul observatorului, înainte de trecerea în ocular sau după traversarea acestuia. Filtrele protectoare de lumină sînt confecţionate din sticlă de culoare galbenă, cu permeabilitate în zona verde-roşu.

În microscopia cu fluorescenţă în spectru vizibil, pentru obţinerea unor imagini de calitate, este important ca lumina de excitaţie să nu se supraadauge luminii de fluorescenţă a preparatului. În acest scop, combinarea filtrelor de excitaţie cu filtrele protectoare de lumină este deosebit de importantă. Combinarea filtrelor trebuie să se facă în mod eficace, lucru posibil dacă alegerea lor se face cunoscînd curbele spectrale ale coeficienţilor de permeabilitate. Cînd se folosesc filtre cu caractere necunoscute, împerecherea lor se face experimental: suprapunerea lor în faţa sursei nu trebuie să permită trecerea radiaţiilor vizibile.

Caracterele funcţionale ale filtrelor sînt notate cu litere şi cifre. Aceste notaţii variază după casa producătoare.

În timpul funcţionării lămpii, dacă se întrerupe observaţia microscopică, este recomandabilă ecranarea fasciculului de radiaţii cu scopul protejării filtrelor. Se recomandă ca filtrele, atunci cînd nu se lucrează cu ele, să fie păstrate în trusă, iar manipularea lor să se facă cu grijă, fără a atinge suprafeţele lor optice.

c) *Microscopul.* Pentru observarea microscopică a preparatelor fluorescente se pot utiliza fie microscoape obişnuite la care se fac unele adaptări, fie microscoape de construcţie specială. La microscoapele obişnuite, fasciculul de radiaţii excitante este dirijat de jos în sus după reflectarea lui de către oglinda microscopului. Observarea se face utilizînd condensatorul de tip Abbé sau condensatorul pentru fond negru, cu care se obţin imagini mai bune. Preparatele se fac pe lame subţiri, sub 1 mm grosime. Montarea preparatului la microscop se face după centrarea sistemului optic, în raport cu sursa de lumină. Ca lichid de imersie care se aplică între condensatorul pentru fond negru şi lama port-obiect, ca şi pentru obiectivul cu imersie, se foloseşte glicerina neutră chimic pură sau alte lichide speciale nefluorescente. Imaginile de fluorescenţă pe fond întunecat, deşi de intensitate mai slabă, datorită lipsei de iluminare a fondului, prezintă un contrast foarte bun pentru microfotografii.

Iluminarea (iradierea) preparatului de sus în jos este posibilă numai la microscoapele de construcţie specială. Prin modificarea introdusă de Brumberg şi Krîlova în construcţia microscoapelor cu sistemul de iluminare de sus în jos, se realizează imagini de fluorescenţă de cea mai bună calitate. Modificarea constă în plasarea deasupra obiectivului a unui reflector selectiv, reprezentat de o oglindă de interferenţă realizată prin suprapunerea mai multor straturi de substanţe transparente, cu indici de refracţie diferiţi. Această oglindă de interferenţă se comportă în mod diferit faţă de razele excitante şi faţă de lumina de fluorescenţă. În timp ce razele excitante (ultraviolete ale spectrului apropiat, violete şi albastru închis ale spectrului vizibil) sînt reflectate şi dirijate prin obiectiv spre preparat, emisiunea de fluorescenţă (cu lungimea de undă mai mare) care se propagă în sens invers radiaţiilor de excitare, traversînd oglinda de interferenţă, intră în ocular şi sînt recepţionate de observator. În acest sistem de iluminare de sus în jos, rolul condensatorului este îndeplinit de obiectivul microscopului. În consecinţă, iluminarea preparatului fiind proporţională cu pătratul aperturii obiectivului, fluorescenţa este cu atît mai intensă, cu cît obiectivul utilizat este mai puternic. Acest sistem de iluminare este avantajos în special în observarea imunofluorescenţei, unde cantitatea de fluorocrom este foarte mică. Iluminarea (iradierea) preparatului în direcţia observării, face posibilă folosirea unor filtre mai puţin dense, iar radiaţiile de excitaţie, reflectate de preparat sau de sistemul de lentile ale obiectivului, ajungînd la observator în cantitate mult mai mică, sînt mai uşor de reţinut de filtrele de protecţie. În aceste condiţii, pe lîngă intensitatea fluorescenţei, contrastul imaginii este deosebit de bun. Cu acest sistem de iluminare se pot studia atît preparatele fine, transparente, cît şi cele groase, netransparente.

Microscoapele de fabricaţie sovietică ML—1, ML—2, MLD—1 şi MLD—2 construite după principiul iluminării preparatului de sus în jos, sînt prevăzute cu lămpi cu mercur puternice, de 250 waţi, iar un sistem de filtre şi diafragme face posibilă reglarea perfectă a imaginii (vezi figurile 30 şi 31).

În microscopia cu fluorescenţă nu este obligatoriu ca optica să fie confecţionată din cuarţ. Sticla obişnuită este suficient de permeabilă pentru radiațiile ultraviolete apropiate și cele din spectrul vizibil cu lungime mică de undă care intră în structura fasciculului de excitație.

Observarea în microscopia cu fluorescență se face în cameră obscură, după acomodarea la întuneric.

Fluorocromarea microorganismelor. Observarea în lumina fluorescentă a microorganismelor fluorocromate, poate furniza date importante în ceea ce privește structura, compoziția chimică și diferitele activități metabolice. Microorganismele pot fi fluorocromate intravital sau după fixare.

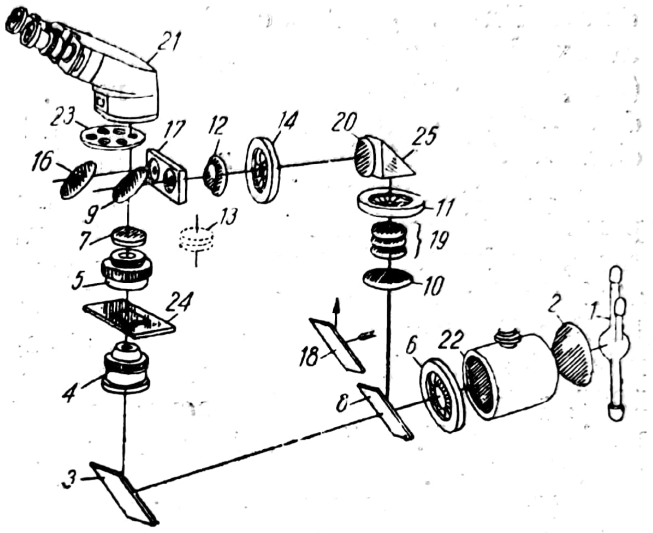

21
23
17
12
14
20
25
16
9
11
13
19
7
5
10
24
18
2
1
6
22
4
8
3

Fig. 30. — Schema optică a microscopului ML_2:

1 — punctul de emitere a luminii (sursa de lumină); 2 — colectorul; 3 — oglindă; 4 — condensor; — 5 — obiectiv; 6 — diafragm plin; 7 — lentilă automată; 8, 9 — oglinzi de proiectarea luminii; 10 — lentilă; 11 — apertura diafragmului; 12, 13 — lentilă; 14 — diafragm plin; 16 — oglindă rotundă; 17 — diafragm; 18 — oglindă; 19 — filtre de lumină; 20 — lentilă; 21 — ocular; 22 — cuvă; 23 — revolver; 24 — preparatul; 25 — prismă.

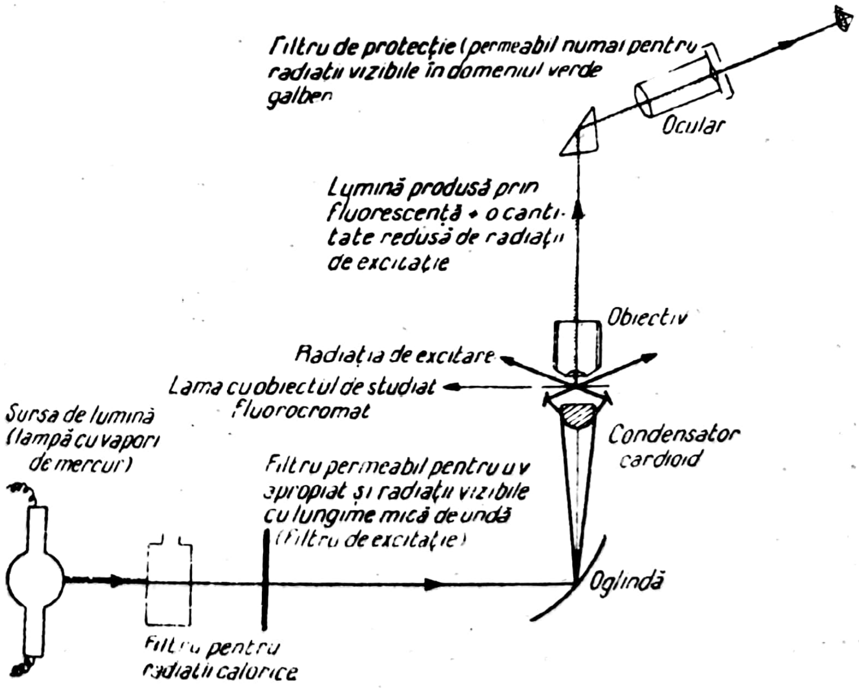

Filtru de protecție (permeabil numai pentru radiații vizibile în domeniul verde galben
Ocular
Lumină produsă prin fluorescență + o cantitate redusă de radiații de excitație
Obiectiv
Radiația de excitare
Lama cu obiectul de studiat fluorocromat
Sursa de lumină (lampă cu vapori de mercur)
Condensator cardioid
Filtru permeabil pentru u v apropiat și radiații vizibile cu lungime mică de undă (Filtru de excitație)
Oglindă
Filtru pentru radiații calorice

Fig. 31. — Schema optică a microscopului cu fluorescență.

a) *Fluorocromarea intravitală a microorganismelor.* Fluorocromarea intravitală este condiționată de folosirea unor soluții de fluorocromi suficient de diluate pentru a permite viabilitatea chiar limitată a microorganismelor de studiat. Colorarea intravitală cu fluorocromi permite într-o serie de cazuri să se pună în evidenţă localizarea unor anumite structuri celulare, ca urmare a capacităţii lor de a se colora selectiv. Astfel, auramina şi derivaţii acridinei (acridin-orange, coriofosfina şi aurofosfina) posedînd un grad de afinitate destul de marcat faţă de nucleoproteine şi acizi nucleici, prin legăturile pe care le formează cu aceste substanţe, le transmit o fluorescenţă destul de puternică. Soluţia de acridin-orange $1\,^{0}/_{00}$ conferă acizilor nucleici şi nucleoproteinelor de tip desoxiribozic o fluorescenţă verde intensă iar compuşilor de tip ribozic (citoplasmatic), o fluorescenţă roşie. Datorită acestor calităţi, soluţiile de acridin-orange şi de aurofosfină sînt utilizate pentru identificarea citochimică diferenţială a acizilor nucleici şi a nucleo-proteinelor.

Fluorocromarea bacteriilor vii cu o soluţie de acridin-orange 1/5 000, permite diferenţierea bacteriilor Gram pozitive care dau o fluorescenţă roşie, de bacteriile Gram-negative care dau o fluorescenţă verde. Meisel atribuie fluorescenţa roşie-portocalie ce se obţine prin fluorocromarea bacteriilor Gram-pozitive cu acridin-orange, prezenţei la suprafaţa celulelor microbiene a ribonucleatului de magneziu. Krieg, în 1954, şi Meisel, în 1957, prin tehnici de fluorocromare intravitală, au diferenţiat substanţa nucleară la *E. coli.*, *Proteus vulgaris*, stafilococ şi unele micobacterii şi corinebacterii.

Tratarea celulelor microbiene cu soluţii slabe de fluorocromi, permite diferenţierea elementelor moarte de cele vii. Această metodă este deosebit de valoroasă în stabilirea comportării bacteriilor sub acţiunea antibioticelor, a dezinfectantelor, a razelor ultraviolete, a razelor X etc. Strugger, tratînd suspensia microbiană cu o soluţie de acridin-orange 1/1 000 timp de 1—2 minute, arată că celulele vii emit o lumină fluorescentă verde, cele moarte emit fluorescenţă roşie, iar celulele în stare de necrobioză emit în portocaliu. Diferenţierea ar fi legată de concentraţia fluorocromului în protoplasmă în care la celulele vii este mai mică. Trebuie notat că această diferenţiere este posibilă numai pentru bacteriile Gram-negative, întrucît cele Gram-pozitive emit totdeauna fluorescenţă roşie, datorită prezenţei magneziului în membrana lor. Krasilnikov şi Behtereva (1956) colorează celulele moarte ale actinomicetelor cu soluţie de primulină 1/5 000—1/50 000. În timp ce celulele vii nu emit fluorescenţă, cele moarte luminează în galben datorită acumulării de fluorocrom în corpul microbian, ca urmare a creşterii permeabilităţii membranei.

Pentru fluorocromarea suspensiilor microbiene vii dăm următorul procedeu: se prepară o suspensie microbiană diluată în soluţia de fluorocrom. Suspensia fluorocromată este examinată ca atare între lamă şi lamelă sau, după centrifugare, se reia sedimentul cu ser fiziologic şi se examinează între lamă şi lamelă. Al doilea procedeu înlătură fluorescenţa fondului dată de soluţia de fluorocrom.

b) *Fluorocromarea microorganismelor fixate.* Fluocromarea directă a microorganismelor fixate şi examinarea lor la microscopul cu fluorescenţă se foloseşte în diagnosticul de laborator al tuberculozei, leprei, difteriei, gonoreei, unor spirochetoze, în rickettsioze şi în unele boli virale. Fluorocromarea diferenţială a microorganismelor fixate se bazează pe particularităţile lor fizico-chimice, permiţînd într-un anumit grad delimitarea între tipurile morfologice apropiate.

Dăm mai jos cîteva metode de fluorocromare a microorganismelor fixate, ce pot fi folosite în tehnicile curente de laborator.

— Bacilul Koch. Metoda de examinare prin microscopia cu fluorescență se bazează pe fluorocromarea preparatului la cald și rezistența germenului la decolorarea ulterioară cu soluții acide și alcool. Avantajul metodei față de colorația Ziehl-Neelsen constă în posibilitatea de cercetare a preparatului cu obiective cu putere de mărire mai mică, ceea ce duce la o creștere a cantității de produs patologic examinat. În plus, microscopia cu fluorescență permite descoperirea formelor care sînt la limita vizibilității și care prin metoda Ziehl-Neelsen nu pot fi puse în evidență.

Metodele de fluorocromare variază după diferiți autori. Fluorocromul cel mai utilizat este auramina.

Metoda Hagemann:

- frotiu fixat la flacără;
- fluorocromare la cald 15 minute cu soluție de auramină:

auramină	0,12 g
fenol lichid	5 ml
apă distilată ad.	100 ml

Se acoperă frotiul, se încălzește de cîteva ori pînă la emiterea de vapori.

- spălare atentă cu apă
- decolorare cu alcool acid:

alcool etilic	90 ml
clorură de sodiu	4 g
acid clorhidric	4 ml
apă distilată ad.	100 ml

- spălare cu apă, uscare, examinare la microscopul cu fluorescență.

Bacilii acido-alcoolo-rezistenți emit o fluorescență galben-aurie. Celelalte bacterii nu emit fluorescență.

Pentru îndepărtarea fluorescenței fondului, diferiți autori au adus modificări metodei Hagemann. Astfel Hermann tratează frotiul, după fluorocromare, cu o soluție de permanganat de potasiu 1/1 000 timp de 5 secunde, după spălarea cu apă urmînd o colorare suplimentară cu albastru Löffler timp de o secundă. Bachmann recomandă folosirea stingătorului Neisser (2 p. sol. albastru de metilen acetic + 1. p. sol. violet de gențiana sau violet de metil 1/300).

Haitinger și Schwertner recomandă o metodă expres de fluocromare cu acridin-gelb. Boy utilizează metoda cu auramină-rodamină, în care, pentru stingerea fondului, folosește fucsina acidă. Metoda lui Degomier folosește auramina iar pentru colorarea de contrast, roșu-tiazin. În metoda cu acridin-orange propusă de Adamczyk, fluorocromarea se face lent în 12 ore, într-o soluție de fluorocrom alcalinizată.

— Bacilul leprei (metoda Hagemann)

Se prepară frotiuri de sînge sau din mucoasa nazală:

- fixare la flacără
- fluorocromare 15 minute cu soluție de berberin sulfat:

acid carbolic lichid	5 ml
berberin sulfat sol. apoasă 1 ‰	95 ml

— spălare în apă caldă (60—70°) pînă cînd frotiul devine incolor. Timpul de diferențiere depinde de grosimea frotiului. Bacilul leprei prezintă o fluorescență galben-verzuie pe fondul închis, nefluorescent.

— Sporii bacterieni (metoda Sinițki-Diacov):

— fixarea frotiului cu alcool clorhidric 3 minute (alcool etilic 70° 97 ml; acid clorhidric concentrat 3 ml);

— spălare cu apă distilată, uscare;

— se acoperă frotiul cu soluție tripaflavină 1/500, încălzindu-se pînă la vapori 10 minute;

— spălare cu apă, examinare.

Sporul prezintă o fluorescență galben-verde, iar corpul microbian o fluorescență slab gălbuie.

Prepararea soluției de fluorocrom: se dizolvă tripaflavină 1/100 în apă distilată tamponată la pH 7, la baia Marie, la 50°. După dizolvare, se diluează la 1/500 și se adaugă 5% acid acetic concentrat.

— Bacilul difteric. Diferențierea bacililor difterici de difteroizi prin microscopia cu fluorescență nu dă întotdeauna rezultate satisfăcătoare. Pentru fluorocromare s-au propus auramina și coriofosfina. Diferența în emiterea fluorescenței o prezintă granulele de volutină prezente în corpul bacilului difteric.

Metoda cu coriofosfină:

— frotiul se fixează cu alcool metilic, după care se spală cu apă și se usucă.

— fluorocromare 10 minute cu soluție de coriofosfină:

Sol. apoasă $1^{0}/_{00}$ de coriofosfină	2 ml
Acid acetic glacial	5 ml
Apă distilată	43 ml

— spălare cu apă, uscare.

Bacilii difterici emit fluorescență verde închis; tipul gravis uneori în galben. Granulele de volutină apar în roșu-cărămiziu. Bacilii difteromorfi apar în verde deschis sau verde-portocaliu, fără granule de volutină.

— Gonococul. Pentru fluorocromarea gonococului în secrețiile purulente, Haitinger recomandă următoarea metodă:

— fixarea frotiului la flacără

— fluorocromare cu acridin-gelb 1/500, 30 de secunde

— spălare cu apă

— diferențiere cu alcool acid 4%, 10—15 secunde

— spălare cu apă, uscare.

Gonococii emit fluorescență verde-aurie, citoplasma leucocitelor apărînd verde închis, iar nucleii leucocitelor în verde-gălbui.

— Alte bacterii. Pentru fluorocromarea leptospirelor și a spirochetei febrei recurente, rezultate bune s-au obținut cu rivanol (Bock și Osterlin).

Rickettsiile se pot pune în evidență prin fluorocromarea preparatelor din culturi, vectori, amprente de la animale etc. Rezultatele cele mai bune s-au obținut prin utilizarea unui amestec de auramină și rivanol 1%, ca stingător al fondului folosindu-se fucsina $1^{0}/_{00}$, care se adaugă în cantitate egală cu soluția de fluorocromi. Examinate în preparat proaspăt sau după fixare, ricketsiile impregnate cu auramină + rivanol emit fluorescenţă verde. Cu rezultate bune se poate utiliza soluţia de acridin-orange 1/50 000, după fixarea cu alcool metilic.

Imunofluorescenţa. Posibilitatea cuplării serurilor imune cu un fluorocrom fără alterarea specificităţii lor, a deschis un cîmp larg de utilizare imunofluorescenţei, metodă relativ nouă, cu mari perspective de a intra în uzul laboratoarelor. Ea se adaugă astăzi celorlalte mijloace de cercetare, dovedindu-se utilă în special în diagnosticul rapid al unor boli cu etiologie microbiană sau inframicrobiană. Ideea de a urmări localizarea unui antigen în ţesuturi utilizînd un ser fluorescent a fost aplicată în 1942 de către Coons, Creech, Jones şi Berliner, care căutau să demonstreze prezenţa fracţiunilor polizaharidice ale pneumococului în organismul şoarecelui infectat. Acelaşi gen de lucrări a fost dezvoltat începînd din 1950, de Coons şi Kaplan; Coons, Snyder, Cheever şi Murray; Hill, Deane, Coons; Kaplan, Coons şi Deane. Autorii tratează secţiunile de ţesuturi la nivelul cărora urmăreau punerea în evidenţă a antigenului, cu un ser omolog fluorocromat. După un timp de incubaţie necesar reacţiei antigen-anticorp, excesul de ser se îndepărtează, preparatul se spală şi se examinează în lumina ultravioletă. Emiterea fluorescenţei marchează cuplarea anticorpilor specifici fluorocromaţi cu antigenul şi topografia tisulară sau celulară a acestuia. Acelaşi principiu de lucru este folosit astăzi pentru punerea în evidenţă a reacţiilor imunoserologice care urmăresc identificarea rapidă a agenţilor patogeni microbieni sau virali, uneori în cantităţi infime, prezenţi în diferite produse patologice.

Sintetizarea izocianatului de fluoresceină şi mai recent a izotiocianatului de fluoresceină, marchează un pas înainte în dezvoltarea imunofluorescenţei, datorită posibilităţilor de cuplare a acestor fluorocromi cu protidele serice, fără alterarea specificităţii moleculelor de gamaglobuline. Obţinerea unor seruri fluorocromate cu înaltă specificitate şi activitate imunologică, face ca metoda să-şi găsească aplicabilitate în rezolvarea unor probleme din ce în ce mai variate.

Pentru efectuarea reacţiilor de imunofluorescenţă este nevoie de utilizarea unui fluorocrom convenabil, care prin cuplarea sa cu anticorpii să nu reducă specificitatea acestora. Obţinerea serurilor imune, concentrarea conţinutului lor în anticorpi (gamaglobuline) şi îndepărtarea celorlalte fracţiuni proteinice, constituie o etapă importantă în pregătirea metodei. Operaţia de cuplare a fluorocromului cu gamaglobulinele şi îndepărtarea excesului de fluorocrom condiţionează calitatea rezultatelor care se verifică riguros printr-o serie de teste de control.

a) *Fluorocromii utilizaţi în imunofluorescenţă.* Dintre fluorocromii cunoscuţi, foarte puţini sînt utilizabili in imunofluorescenţă. Ei trebuie să conserve specificitatea anticorpilor cu care se cuplează şi să emită o fluorescenţă clară, suficientă pentru a putea fi observată. Cu rezultatele cele mai bune se întrebuinţează izocianatul de fluoresceină, izotiocianatul de fluoresceină şi lizaminrodamina B-200-izotiocianat. Aceşti fluorocromi se cuplează cu proteina printr-o grupare carbamido. Datorită stabilităţii şi fluorescenţei sale convenabile, izotiocianatul de fluoresceină se utilizează cu cele mai bune rezultate. Substanţa cristalizată, cu un grad de puritate mare, se poate păstra în fiole în vid. Cu rezultate bune se utilizează şi derivatul sulfoclorurat al Lissamin-Rhodaminei B 200. Cuplarea acestuia cu moleculele de gamaglobuline se face printr-o grupare sulfonamido.

b) *Obţinerea serurilor imune şi separarea fracţiunilor globulinice.* În reacţiile imunologice cu anticorpi fluorescenţi, limitele specificităţii sînt determinate de structura antigenelor care intră în competiţie şi de serurile fluorescente. Intensitatea colorării imunofluorescente a antigenelor este direct legată de titrul fluorescent al serului specific.

Pentru obţinerea serurilor imune, animalele furnizoare se aleg în funcţie de antigenele folosite pentru imunizare. Selecţionarea animalelor trebuie să se facă cu minuţiozitate. Înainte de imunizare se cercetează titrurile anticorpilor naturali care, dacă sînt la valori mari faţă de mai multe antigene, pot duce la reacţii nespecifice. Trebuie să se ţină seama că uneori verificările serurilor iniţiale prin reacţii de aglutinare sau de precipitare nu sînt suficiente pentru punerea în evidenţă a anticorpilor incompleţi, monovalenţi.

Calitatea antigenelor ce se folosesc pentru imunizare trebuie de asemenea verificată. Se vor alege tulpini microbiene tipice, antigenice, aglutinabile specific, neaglutinabile de serurile eterologe.

Cel mai frecvent, pentru obţinerea serurilor antimicrobiene se foloseşte iepurele. Serurile antiglobulinice necesare metodelor indirecte de imunofluorescenţă se pot obţine de la capră, oaie, cocoş etc. Schemele de imunizare pot varia după starea animalului şi după reactivitatea acestuia faţă de introducerea antigenului. Calea de administrare intravenoasă dă rezultatele cele mai bune. Uneori, pentru obţinerea de titruri înalte, în procesul de imunizare se asociază un adjuvant (Freund). Sîngerările de probă se fac la 7—10 zile de la ultima inoculare. Serurile obţinute se verifică pentru activitate şi pentru specificitate. În vederea fluorocromării se aleg seruri cu titrul aglutinant peste 1/3 200 şi cu titrul precipitant peste 1/10 000. Pentru îndepărtarea anticorpilor eterologi se folosesc metodele curente de adsorbţie.

Pentru cuplarea cu fluorocromul se pot folosi sau serurile integrale sau numai gamaglobulinele extrase din acestea. Este preferabilă cuplarea gamaglobulinelor separate, realizîndu-se astfel o concentrare a proteinelor imune active în unitatea de volum. În plus, îndepărtarea albuminelor şi a celorlalte fracţiuni globulinice, reduce cantitatea de fluorocrom necesară. Pentru conservarea mai îndelungată, se recomandă cuplarea cu serul integral. Pentru obţinerea unui material reactiv de calitate, se preferă cuplarea numai a fracţiunilor gamaglobulinice.

Separarea fracţiunilor gamaglobulinice se poate obţine utilizînd diferite metode de precipitare (cu sulfat de sodiu, sulfat de amoniu, alcool) sau trecerea serului prin răşini schimbătoare de ioni. O metodă simplă şi care dă rezultate bune este precipitarea cu sulfat de sodiu. Serul se supune la două precipitări succesive sub agitare continuă la 37°, după care preparatul obţinut se purifică prin dializă făţă de apă bidistilată pentru îndepărtarea ionilor SO_4 şi apoi contra soluţiei 0,15 M de clorură de sodiu tamponată la pH 7,2 pentru restabilirea forţei ionice. După obţinerea gamaglobulinelor, se verifică activitatea imunologică a acestora şi se determină concentraţia în proteine, în vederea fluorocromării.

c) *Conjugarea gamaglobulinelor cu fluorocromul.* Pentru cuplare, concentraţia în proteine a soluţiei de gamaglobuline trebuie să fie de 1—2%. Se preferă conjugarea de soluţii cît mai concentrate. Cuplarea se face în mediu alcalin, acesta realizîndu-se prin utilizarea unei soluţii tampon carbonat-bicarbonat cu pH 9. Pentru fluorocromare, cantitatea optimă de fluorocrom variază după calitatea sa. În cazul utilizării izotiocianatului de fluoresceină, proporţia este de 0,7—5 mg la 100 mg proteine. Întrebuinţarea de cantităţi mai ridicate nu este recomandabilă, excesul putînd altera moleculele de proteine. Ingredientele (gamaglobulinele în proporţie de 1—2% în soluţie de clorură de sodiu 0,15 M tamponată cu fosfaţi la pH 7,2 în proporţie de 90%, soluţia tampon carbonat-bicarbonat în proporţie de 10% şi cantitatea necesară de fluorocrom) se amestecă lent cu ajutorul unui dispozitiv mecanic, timp de 6—18 ore la temperatura de 2—4°. Dizolvarea fluorocromului şi cuplarea lui cu moleculele de gamaglobuline se face lent. Cea mai mare cantitate de gamaglobuline se leagă cu fluorocromul în primele 3 ore. Ţinînd seama de dinamica cuplării fluorocromului cu gamaglobulinele, unii autori consideră că prelungirea timpului de contact peste 6 ore apare inutilă. În mod asemănător se procedează şi în cazul utilizării izocianatului de fluoresceină şi al derivatului sulfoclorurat al Lisamin-Rhodaminei B 200.

O operaţie importantă la care se supun gamaglobulinele cuplate este aceea de îndepărtare a fluorocromului necuplat sau cuplat slab sau în exces cu proteinele imune, cu scopul evitării impregnărilor fluorescente nespecifice. Îndepărtarea sa realizează prin dializa conjugatului în sac de celofan, la rece, contra unei soluţii saline tamponate la pH 7,2. Dializa durează pînă la 3—5 zile, în care timp lichidul de dializă se schimbă de mai multe ori. Prelungirea dializei peste 5 zile nu este recomandabilă. Lichidul de dializă se controlează în lumină ultravioletă, în final trebuind să fie lipsit de fluorescenţă. Întrucît o îndepărtare completă a fluorocromului liber numai prin dializă nu este posibilă, în ultimul timp s-au elaborat metode rapide de purificare cu ajutorul răşinilor schimbătoare de ioni (AV 17, AV 27) sau cu dextran polimerizat (Sephadex G—25 sau G—50). Aceste materiale dispuse în coloană, adsorb fluorocromul liber, lăsînd să treacă numai proteinele conjugate. Adsorbţia fluorocromului liber cu cărbune activ este mai puţin recomandabilă întrucît reduce activitatea imunologică. Într-o ultimă etapă, pentru îndepărtarea anticorpilor nespecifici cuplaţi cu fluorocromul sau a fluorocromului cuplat în exces cu anticorpii, conjugatul se supune unei adsorbţii pe pulbere de diatomee sau mai bine, pe pulbere de ficat sau pe DEAE-celuloză (dietilaminoetil-celuloză).

d) *Controlul serurilor fluorocromate.* Un ser fluorescent pentru a fi utilizabil, trebuie să coloreze suficient şi specific. Aprecierea capacităţii de colorare se face pe baza colorării fluorescente a preparatelor care conţin antigene omologe. Titrul de colorare este dat de diluţia limită a serului cuplat, la care are loc o fluorescenţă suficient de puternică a antigenului omolog în regimul stabilit (timp şi temperatura reacţiei imunologice). Pentru aprecierea intensităţii fluorescenţei se foloseşte un sistem de notare convenţional, de exemplu :

++++ = fluorescenţă foarte puternică, cu evidenţierea clară a morfologiei bacteriilor.
+++ = fluorescenţă puternică, morfologia bacteriilor vizibile datorită stratului de anticorpi fluorescenţi care le acoperă.

++ = fluorescență mai slabă, cu morfologia bacteriilor vizibilă la limită.

+ = capsula de anticorpi nu se observă. Apare o lumină fluorescentă slabă.

Capacitatea de colorare a unui ser fluorescent depinde de cantitatea de fluorocrom legat de proteinele imune și de concentrația acestora în unitatea de volum a serului fluorescent.

Proprietățile imunoserologice ale conjugatului se verifică prin reacții de aglutinare și de precipitare cu antigenele omologe. În general, titrurile conjugatelor sînt cu puțin mai scăzute decît ale materialului inițial dinainte de conjugare.

Specificitatea serurilor fluorescente se controlează prin tratarea de preparate ce conțin antigene omologe și heterologe. Eliberarea deplină a serurilor de fluorocrom liber se poate determina prin electroforeza pe hîrtie sau în gel de agar, sau prin cromatografia pe hîrtie.

Serurile fluorescente se pot conserva timp îndelungat, pînă la 2 ani, la +4°, fără pierderea calităților lor imunologice. Se recomandă adăugarea de mertiolat 1/5 000. Sub formă liofilizată serurile fluorescente se pot păstra la întuneric, la temperatura camerei, fără alterarea calităților lor.

e) *Metode de lucru în imunofluorescență*

— Efectuarea preparatului. Pentru imunofluorescență se utilizează lame din sticlă obișnuite, foarte curate și degresate. Dacă se lucrează cu condensatorul pentru fond întunecat, grosimea lamelor trebuie să fie sub 1 mm. Materialul de studiat (suspensii microbiene din culturi, diferite produse, amprente de organe etc.), se depune într-un strat cît mai subțire, pe o suprafață redusă, ce se marchează cu creionul dermatograf pe partea inferioară a lamei și se lasă să se usuce.

— Fixarea. Agentul fixator se alege în funcție de comportarea față de acesta a antigenelor ce urmează să participe la reacția imunologică.

Fixarea la căldură (la flacără) poate fi întrebuințată în general cu rezultate bune. Dacă antigenul ce urmează să fie decelat este termolabil, se recurge în mod obligator la un alt fixator.

Cea mai bună fixare se realizează cu acetonă chimic pură, timp de 15 minute, la —15°. Printre alți fixatori sînt : alcoolul etilic absolut (15 minute), dioxanul, vaporii de formol, amestecul în părți egale de alcool etilic și eter, lichidul Bouin, lichidul Carnois.

— Fluorocromarea preparatului. În imunofluorescență se deosebesc două metode de lucru :

Metoda directă constă în tratarea preparatului fixat, cu serul specific antimicrobian, fluorocromat. Este metoda care inițial a fost pusă la punct de Coons. Corpul microbilor este fluorescent prin adsorbția directă la suprafață a gamaglobulinelor specifice fluorescente (fig. 32). Serul fluorescent se utilizează diluat la titrul fluorescent determinat în prealabil. Pe frotiu se depune o picătură de ser, iar preparatul se montează într-o cameră umedă pentru evitarea evaporării. Ritmul reacției imunologice variază după temperatura la care are loc incubația. Cuplarea rapidă între antigen și anticorp se realizează la 37°. Timpul de reacție în acest caz este de 10—15 minute. O cuplare medie se obține în 15—20 de minute, la 16—20°. La temperatura de 2—4°, timpul de incubaţie trebuie prelungit la 1—2 ore (cuplare lentă). Prelungirea incubaţiei peste timpul indicat corespunzător fiecărei temperaturi, nu se recomandă, putînd duce la adsorbţii nespecifice de anticorpi fluorescenţi. Un ser cu activitate bună trebuie să fluorocromeze antigenul omolog în 10 minute la 37°.

După incubaţie, preparatul se spală prin scufundare timp de 10—15 minute, în 2 băi succesive cu apă rece de robinet sau cu soluţie de clorură de sodiu 0,15 M, tamponată la pH 7,2, după care se usucă prin aşezare în poziţie verticală sau cu ajutorul hîrtiei de filtru.

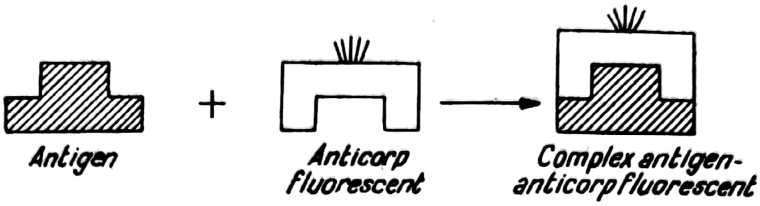


Fig. 32. — Metoda directă de utilizare a anticorpilor fluorescenţi.

Examinarea se face la microscopul cu fluorescenţă, utilizînd obiectivul cu imersie. Realizarea unei măriri de 600—900 × este necesară pentru a putea observa reacţia specifică antigen-anticorp. Afirmarea acesteia este condiţionată de distingerea cu claritate a coroanei puternic fluorescente formate prin adsorbţia anticorpilor la periferia celulei microbiene. Imaginea trebuie să fie corespunzătoare notaţiei cu ++++ sau cu +++. Morfologia bacteriei se conservă totdeauna, putîndu-se distinge bacilii, cocobacilii, cocii etc. Datorită stratului de anticorpi fluorescenţi, dimensiunile celulei apar mai mari decît în realitate. Imaginile în care intensitatea fluorescenţei este slabă (++), deşi luminozitatea de la periferia bacteriei este netă, corespund rezultatelor dubioase, neconvingătoare, în care repetarea reacţiei este necesară. Fondul preparatului trebuie să apară complet întunecat sau poate prezenta o fluorescenţă discretă, difuză. În preparatele microscopice eterogene, corpii microbieni nespecifici pot prezenta o fluorescenţă foarte slabă, fără stratul periferic de anticorpi, corespunzătoare notaţiei cu + sau ±.

Metoda indirectă nu identifică antigenele în mod direct prin fluorocromarea lor cu un ser specific fluorescent. Ea pune în evidenţă stratul de anticorpi specifici, nefluorescenţi, cu care preparatul a fost tratat în prealabil, utilizînd un ser antigamaglobulinic fluorocromat, activ faţă de specia animală pe care s-a obţinut serul imun antimicrobian. Metoda a fost elaborată de Weller şi Coons şi în principiu este asemănătoare testului antiglobulinic. Reacţia se efectuează în doi timpi. Preparatul fixat se tratează cu ser specific nefluorocromat. După incubare timp de 10—15 minute, la 37°, preparatul se spală 10 minute în ser fiziologic tamponat la pH 7,2. După uscare, într-un al doilea timp, complexul antigen-anticorp nefluorocromat este tratat cu ser antiglobulinic fluorescent, activ faţă de gamaglobulinele speciei de la care s-a obţinut serul specific. Incubarea durează 10—15 minute la 37°, după care preparatul se spală şi se usucă. Corpul microbian cu un dublu strat de anticorpi, apare luminos la periferie datorită fluorescenţei învelişului exterior format de serul antiglobulinic. Criteriile de afirmare a specificității reacției imunologice sînt aceleași ca la metoda directă. Metoda indirectă este mai comodă decît metoda directă, nefiind nevoie decît de fluorocromarea serului antiglobulinic.

În același mod se poate evidenția o reacție de fixare a complementului (fig. 34). Complexul antigen-anticorp care a fixat complementul se tratează cu un ser anticomplement fluorocromat. Aplicațiile acestei metode sînt restrînse.

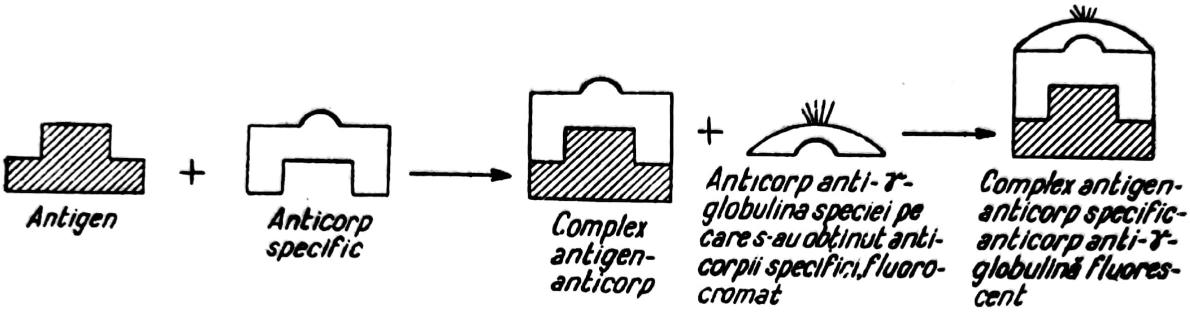

Antigen
+
Anticorp specific
Complex antigen-anticorp
+
Anticorp anti-γ-globulina speciei pe care s-au obținut anticorpii specifici, fluorocromat
Complex antigen-anticorp specific-anticorp anti-γ-globulină fluorescent

Fig. 33. — Metoda indirectă de imunofluorescență.

Adsorbția fagului specific se poate pune în evidență utilizînd un ser fluorescent antifag. Bacteriofagul cuplat cu serul fluorescent este adsorbit pe corpul microbian care apare luminos la periferie.

Imunofluorescența poate fi utilizată și cu scopul identificării anticorpilor. În acest caz, cu serul de cercetat se tratează antigenul test. Într-o a doua fază, antigenul se tratează cu ser specific fluorocromat. Absența fluorescenței bacteriilor, datorită blocării prealabile a antigenelor lor cu serul de cercetat, indică rezultatul pozitiv al reacției.

f) *Aplicații ale imunofluorescenței în bacteriologia medicală*

Valoarea imunofluorescenței este conferită de etichetarea ei ca metodă rapidă de identificare a agenților patogeni. Într-adevăr, aplicarea ei la nivelul diferitelor etape ale schemei clasice de diagnostic bacteriologic, poate grăbi obținerea rezultatelor. Metoda poate fi aplicată în unele cazuri direct asupra materialului de examinat, în altele după prealabile îmbogățiri sau izolări pe medii selective sau diferențiale. Valoarea ei apare deosebită în unele boli infecto-contagioase în care diagnosticul precoce este impus pe de o parte de necesitatea instituirii de urgență a măsurilor de profilaxie și, pe de alta, de aplicarea din timp a tratamentului adecvat al bolnavilor.

Pînă în prezent imunofluorescența a fost verificată într-o serie de afecțiuni cu etiologie microbiană. Rezultate bune s-au obținut în infecțiile cu germeni din grupul *Shigella*, în care diagnosticul de orientare se poate pune în 6—8—10 ore. Identificarea coloniilor suspecte dezvoltate după 24 de ore se poate face imediat. În salmoneloze identificarea antigenelor O și Vi se poate face cu certitudine, însă a antigenelor H este nesigură datorită situării lor în flagelii bacteriilor. Rezultatele cele mai bune s-au obținut din hemoculturi. În enterocolitele cu germeni din grupul *Escherichia* s-au obținut rezultate pozitive utilizînd în special metoda directă. Deosebit de utilă apare, aplicarea imunofluorescenței în diagnosticul holerei. După o prealabilă îmbogățire a germenilor în apă peptonată alcalină, s-au obținut rezultate pozitive la 3—6—9 ore de la primirea produsului (Finkelstein şi La Brec). Verificarea imunofluorescenţei în pesta experimentală a dat de asemenea rezultate bune. Serul specific obţinut prin imunizarea rozătoarelor cu antigen capsular, diferenţiază foarte bine *P. pestis* de bacilii pseudotuberculozei. Datorită labilităţii antigenului capsular, fixarea preparatelor se face cu Dioxan, timp de 10 — 15 minute. Se pot examina direct produse de la bolnavi (spută, secreţie bubonică), tratate cu serul

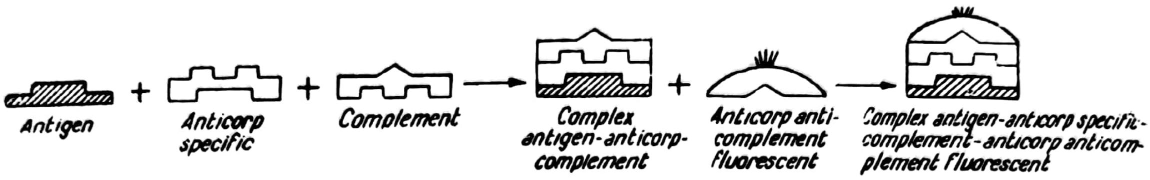

Antigen
Anticorp specific
Complement
Complex antigen-anticorp-complement
Anticorp anti-complement fluorescent
Complex antigen-anticorp specific-complement-anticorp anticomplement Fluorescent

Fig. 34. — Punerea în evidenţă a reacţiei de fixare a complementului prin imunofluorescenţă.

specific fluorocromat. Pe produsele provenite de la cadavre, rezultatele sînt mai puţin satisfăcătoare. În diagnosticul brucelozei, rezultate bune s-au obţinut cercetînd produsele de avort de la animalele bolnave fie direct, fie pentru identificare din culturile mixte provenite din însămînţări. Este posibilă identificarea brucelelor din hemoculturi. În tularemie, identificarea pe amprente din organe de la animale dă rezultate bune, pe cînd cercetarea directă a secreţiei din ulceraţiile cutanate provenite de la om nu este satisfăcătoare. Pentru diagnosticul antraxului se examinează direct materialul obţinut din pustulă de la bolnavi sau din organe de la animale. Tratarea preparatului cu serul antimicrobian specific fluorocromat şi în special cu serul anticapsular pune în evidenţă uşor bacteridia cărbunoasă. Pe amprentele din organele limfatice (splină), capsula apare fluorescentă. Sporii, de asemenea, adsorb serul fluorocromat. Fluorocromarea antracoizilor cu serul anticărbunos deşi mai slabă, impune o prealabilă adsorbţie. În diagnosticul leptospirozelor, prin imunofluorescenţă, este posibilă determinarea tipului de culturi. Aplicarea metodei indirecte în diagnosticul serologic al sifilisului este bine pusă la punct. Se menţine însă dificultatea întreţinerii unei tulpini de treponeme. Imunofluorescenţa în diagnosticul rickettsiozelor face posibilă punerea în evidenţă a agenţilor patogeni cu rapiditate, examinînd direct sîngele bolnavului, prelevat în timpul febrei. Rezultatele cele mai bune se obţin pentru *Coxiella burneti*. Identificarea rickettsiilor din vectori (păduchi, căpuşe) este posibilă, tratînd amprente cu serul specific fluorocromat.

În prezent, diagnosticul prin imunofluorescenţă în afecţiunile cu etiologie microbiană este în plină dezvoltare. Aceasta este condiţionată de obţinerea unor seruri imune cu specificitate strictă, standardizate, precum şi de instruirea personalului de specialitate.

Fiziologie bacteriană

DR. LYDIA MESROBEANU

Introducere

Fiziologia microbiană are ca obiect, atît studiul proceselor fizicochimice care au loc în celula microbiană, cît şi al acelora care sînt determinate de microorganism, în cursul dezvoltării sale, în mediul înconjurător.

Datorită recentelor progrese realizate în domeniul anatomiei şi histochimiei microbiene, a devenit posibilă, în mare măsură, nu numai cunoaşterea constituţiei chimice a fiecărei entităţi morfologice a microorganismelor, dar şi localizarea diverselor funcţii fiziologice la nivelul acestor structuri, diferenţiate în vederea rolului pe care îl îndeplinesc.

Fiziologia microbiană este dominată de o caracteristică particulară, care o diferenţiază de fiziologia animală şi vegetală, anume : marea diversitate a tipurilor de metabolism care se manifestă nu numai de la o specie la alta, sau deseori, în cadrul aceloraşi specii, de la o tulpină la alta, dar însăşi aceeaşi tulpină poate prezenta modificări metabolice profunde, după natura mediului în care se dezvoltă.

Puterea de adaptare la condiţiile mediului, calitate generală a materiei vii, atinge la bacterii cele mai mari posibilităţi, ilustrate şi prin faptul că, spre deosebire de celelalte vieţuitoare, aceste fiinţe pot genera enzime speciale, atunci cînd apar în mediu anumite substanţe nutritive sau nocive (de exemplu, penicilinaza = enzimă care distruge penicilina).

O altă caracteristică dominantă a fiziologiei microbiene este activitatea metabolică extrem de intensă a microorganismelor. Datorită marii lor puteri de multiplicare şi rapidităţii cu care transformă materia nutritivă, microorganismele joacă un rol considerabil în natură. Ele asigură circulaţia materiei completînd ciclurile pe care elementele biogene (carbonul, azotul, fosforul, sulful etc.) le parcurg la suprafaţa globului terestru, făcînd în acest mod posibilă „viaţa” plantelor şi animalelor.

Constituţia chimică a bacteriilor

Toate procesele care au loc în celula microbiană sînt asociate cu importante transformări chimice ale constituenţilor săi.

În consecinţă, cunoaşterea compoziţiei chimice a celulei bacteriene contribuie la cunoaşterea proceselor lor vitale. Acest studiu trebuie însă întreprins ţinînd seama de natura mediului de cultură şi de vîrsta celulei în momentul analizei, deoarece aceşti factori pot influenţa considerabil, atît calitativ, cît şi cantitativ, compoziţia chimică a bacteriilor. Numai în condiţii riguros identice de cultură şi vîrstă, pentru o aceeaşi tulpină, se pot stabili anumite limite în care pot varia diverşii constituenţi celulari.

Întocmai ca şi celulele plantelor şi animalelor, bacteriile conţin: apă, săruri minerale, glucide, lipide, proteine, vitamine, pigmenţi precum şi o serie de alţi constituenţi cu rol de catalizatori ai proceselor vitale.

Apa. Toate fenomenele vitale se petrec în mediu apos şi cu participarea apei. Din această cauză, componenta predominantă a constituţiei celulare este apa care se află atît în stare liberă cît şi unită cu diverse componente celulare. Microorganismele conţin foarte mari cantităţi de apă: după datele din literatură, media ar fi de 80% din greutatea umedă a germenilor.

Apa formează mediul în care sînt dispersate substanţele organice sub forma coloidală (albumine, glucide, lipide) şi în care sînt dizolvate o serie de alte substanţe (săruri minerale, zaharuri simple, aminoacizi, vitamine etc.), necesare proceselor vitale. Graţie disociaţiei în ioni OH^- şi H^+, apa joacă un rol determinant în reacţia mediului. Procesele de oxidoreducere atît în prezenţa oxigenului (procese aerobe), cît şi în absenţa lui (procese anaerobe) sînt totdeauna însoţite de adiţionare sau eliberare de apă. Apa intră, de asemenea, în foarte multe combinaţii chimice, ca: albuminele, glucidele etc., luînd parte activă la reacţiile care se petrec în anabolismul-catabolismul acestor substanţe.

Necesitatea în apă a celulei microbiene este controlată de puterea regulatoare a membranei şi protoplasmei, care supunîndu-se legilor osmozei şi difuziunii asigură pătrunderea substanţelor dizolvate din mediul nutritiv, precum şi excreţia produselor de catabolism.

Sporii, spre deosebire de formele vegetative, au un conţinut mult mai redus în apă, iar cea mai mare parte se află nu în stare liberă ci sub formă de combinaţii chimice, ceea ce contribuie la rezistenţa acestor formaţiuni la temperaturi ridicate.

Substanţele minerale. Cantitatea substanţelor minerale în celula microbiană este cuprinsă între 2 şi 30% din greutatea lor uscată. Cantitatea acestor constituenţi celulari variază, atît calitativ, cît şi cantitativ, cu natura mediului de cultură şi cu vîrsta celulară. Celulele tinere sînt de 6—7 ori mai bogate în substanţe minerale decît cele bătrîne.

Diversele variante ale aceliaşi specii, cultivate pe medii strict identice, prezintă diferenţe marcate în conţinutul mineral. Dîmboviceanu şi Barber (1931) au arătat că variantele rugoase sînt în mod constant mai bogate în substanţe minerale decît cele netede, la următoarele specii microbiene: *B. anthracis*, *B. aertrycke* şi vibrionul holeric.

Datorită cantităţilor mari de electroliţi liberi în celula bacteriană presiunea internă este considerabilă.

Elementele principale care compun cenuşa germenilor sînt, în ordinea importanţei, următoarele : fosfor, potasiu, sodiu, magneziu, calciu, sulf, clor şi fier.

O parte din aceste elemente intră în constituţia diverselor componente celulare, iar altele joacă rol de activatori ai diferitelor procese enzimatice. Astfel, fosforul ia parte la formarea nucleoproteinelor, anumitor clase de lipide sau zaharuri, iar sub formă de acid fosforic este implicat în multiple fenomene metabolice. Acest element, prin legăturile sale „macroergice", acumulează cantităţi considerabile de energie necesară efectuării proceselor vitale. *Sulful* ia parte la formarea anumitor aminoacizi (metionina) sau vitamine (biotina şi tiamina). *Calciul* se găseşte în constituţia unor lipide, glucide şi participă activ la anumite procese enzimatice, cum este, de exemplu, activarea gelatinazei — ferment bacterian care hidrolizează gelatina. *Magneziul* are, de asemenea, rol de activator al enzimelor bacteriene. *Fierul* joacă un rol important în fenomenele de oxidare celulară, iar în anumite concentraţii, adiţionat la medii, stimulează toxigeneza bacilului difteric, bacilului Shiga etc. sau pigmentogeneza, ca la bacilul piocianic. *Potasiul* a fost găsit de Barber în cantităţi mult mai mari în formele virulente de *Bacillus anthracis*, iar grupa stafilococilor este deosebit de bogată în acest element. De asemenea, potasiul intervine în multe procese fiziologice, ceea ce explică de ce acest metal, alături de fosfor, este printre cele mai abundente elemente ale reziduului mineral. *Sodiul*, deşi este găsit în cenuşa bacteriilor şi în cantitate destul de mare, totuşi asupra rolului său în celulă nu există date precise.

O serie de alte elemente, cum ar fi de exemplu : cuprul, magneziul, zincul etc. sînt implicate în activarea proceselor enzimatice bacteriene.

Cercetările privitoare la nevoile bacteriilor în substanţe minerale au luat o foarte mare dezvoltare o dată cu studiile întreprinse pentru prepararea mediilor de cultură sintetice adecvate cultivării anumitor specii microbiene. Stabilirea necesităţilor minimale în aceste elemente nu este însă o problemă simplă, întrucît există cerinţe extrem de variate de la o specie la alta. S-a constatat că nu se poate schimba cu uşurinţă, în compoziţia unui mediu, un element prin altul, deoarece unele sînt toxice pentru celula bacteriană. Este necesar, adesea, pentru anihilarea acestei toxicităţi, să se introducă simultan anumite alte elemente.

Există o serie de elemente care, în cantităţi extrem de mici, pot stimula o serie de fenomene vitale. Astfel, *cuprul* în cantităţi infinitezimale stimulează toxinogeneza bacilului difteric. De obicei aceste elemente nu se încorporează la mediile de cultură, ele fiind aduse ca impurităţi de către ingredientele care intră în compoziţia lor.

Glucidele. Conţinutul în glucide al celulei bacteriene, deşi este diferit, după specia şi varianta cercetată, după vîrsta şi condiţiile de cultură, a fost stabilit că reprezintă între 12 şi 28% din greutatea uscată a celulei.

Microorganismele diferă foarte mult între ele, prin natura, complexitatea şi modul de metabolizare a glucidelor. Aceşti constituenţi îndeplinesc în celula microbiană, ca şi în oricare celulă, un dublu rol : plastic şi energetic deoarece intră în compoziţia diferitelor straturi microbiene şi asigură totodată — prin transformările fermentative sau oxidative pe care le suferă — energia necesară desfăşurării proceselor metabolice.

Glucidele se găsesc în celulă, atît sub formă de polizaharide, cît şi sub formă de zaharuri simple.

Din punct de vedere chimic, polizaharidele bacteriene sînt clasificate în 3 categorii :

1. *Hexozane*. Sînt polizaharizi formaţi din molecule de hexoze şi care au fost descrise la o serie de bacterii. Astfel : *Leuconostoc mesenteroides* produce un polimer de glucoză denumit *dextran*, care a fost preparat în stare pură şi întrebuinţat ca substituent al sîngelui. Un alt polimer de hexoză este *fructozanul*, descris la *B. mesentericus*, *B. subtilis*, la unele tulpini de *Streptococcus salivarius* etc. La *Aerobacter aerogenes* s-a găsit galactoză.

2. *Pentozane*. Sînt polimeri de pentoze descrişi la bacilul difteric, bacilul tuberculozei.

3. *Polizaharide mixte*. Sînt substanţe formate din polimerizarea moleculelor de zaharuri simple şi din acizi uronici. Astfel, substanţa capsulară a streptococului hemolitic este un polimer de acid glucuronic şi N-acetil-glucozamină, denumit acid hialuronic. În această categorie mai intră şi substanţele denumite „gume" sau mucilagii", sintetizate de o serie de microorganisme. Acestea sînt, de obicei, polimeri de pentoze, hexoze, acizi uronici, care au proprietatea de a forma geluri cu proteinele. Natura acestor substanţe nu este însă pe deplin cunoscută.

Polizaharidele bacteriene specifice. Sînt polizaharide care au proprietatea de a precipita specific cu antiserurile preparate cu bacteriile din care s-au extras aceste substanţe. Polizaharidele specifice au fost îndeosebi studiate de imunochimişti. Ele au fost descoperite şi izolate de Dochez şi Avery (1917), din filtratele culturilor de pneumococ tip *I*, *II*, *III* şi au fost puse, de asemenea, în evidenţă în serul şi urina bolnavilor de pneumonie prin reacţii de precipitare cu serul antipneumococic, omolog. Această descoperire a deschis un drum nou în imunologie, deoarece s-a demonstrat ulterior prin extinderea cercetărilor, că specificitatea este legată la cei mai mulţi germeni, de substanţe de natură polizaharidică şi că ea constituie o calitate a unor constituenţi chimici bine determinaţi, şi nu a întregii celule bacteriene, cum se crezuse pînă atunci.

Polizaharidele specifice se găsesc atît la germenii gram-pozitivi cît şi la cei gram-negativi, iar la aceştia din urmă sînt prezenţi la variantele netede („S"), şi rugoase („R") cu proprietăţi chimice şi mai ales serologice diferite.

În ceea ce priveşte proprietăţile biologice ale polizaharizilor specifici, există diferenţe fundamentale între germenii gram pozitivi şi gram-negativi.

Majoritatea microorganismelor gram-pozitive au în compoziţia lor polizaharide specifice care, izolate, precipită cu serul antibacterian, dar sînt netoxice şi neantigenice. Din această cauză acestea au fost denumite antigene reziduale sau haptene.

Bacteriile gram negative în faza „S" au polizaharizii specifici cuplaţi cu fosfolipide şi polipeptide. Aceste substanţe extrase din celula bacteriană sînt specifice, toxice şi antigenice. Ele au fost denumite „antigene complete" sau „antigene somatice" şi reprezintă în acelaşi timp endotoxina bacteriilor respective.

La bacteriile Gram-pozitive se crede că polizaharizii specifici sînt cuplaţi cu proteinele, pentru a forma antigene complete.

Bacteriile acidorezistente conţin, în structura lor, diverse polizaharide, atît de natura haptenelor, cît şi inerte din punct de vedere serologic. Ele mai elaborează, în timpul creşterii lor, polizaharide în mediul de cultură.

Natura zaharurilor simple care intră în compoziţia polizaharidelor specifice a fost studiată la foarte multe bacterii începînd cu polizaharidele diverselor tipuri de pneumococ. În tabelul II se poate vedea compoziţia chimică a polizaharidelor specifice extrase de la tipurile I, VII, IX, XIV, XVIII precum şi a polizaharidului C care este specific de specie.

Tabelul II

Pneumococ	Constituţia polizaharidului specific
tip I	zaharuri aminate, acid galacturonic
„ II	L-ramnoză, D-glucoză — zaharuri aminice
„ III	acid celobiuronic, glucoză
„ IV	glucoză, zaharuri N-acetilaminice
„ V	acizi uronici, glucoză, zaharuri aminice neidentificate
„ VI	galactoză, glucoză, ramnoză
„ VII	galactoză, glucoză, ramnoză
„ IX	glucoză, acizi uronici şi zaharuri aminate
„ XIV	glucoză, galactoză, N-acetil glucozamină
„ XVIII	ramnoză, glucoză
C	glucozamina, galactoză, manoză.

Polizaharidele germenilor gram-negativi au fost studiate mai ales la grupul *Salmonella* obţinîndu-se rezultate importante.

Se ştie că la germenii din această grupă polizaharidele specifice sînt cuplate la variantele „S" cu proteine şi lipide formînd macromolecule cu caractere toxice, specifice şi antigenice. În compoziţia polizaharidelor specifice ale acestor germeni s-au identificat hexozamine (glucozamină şi galactozamină), heptoze, hexoze, pentoze. De asemenea, Staub şi Westphal au identificat o nouă clasă de zaharuri simple a căror structură a fost lămurită, constatîndu-se că sînt 3,6-didesoxihexoze. După bacteria de la care s-au extras prima dată aceste zaharuri au primit următoarele denumiri :

Abecroza (3 desoxi-D-fucoza) : *S. abortus equi*, *S. typhimurium*, *S. paratyphi B.*, *S. newport*, *S. kottbus.*

Colitoza (3-desoxi-L-fucoză) : *E. coli* O_{111} şi în grupa P *Salmonella.*

Paratoza (3,6-dideroxi-D-glucoză) : *S. paratyphi A.*

Tiveloza (3-desoxi-D-ramnoză) : *S. typhi.*

Ascariloza (3-desoxi-L-ramnoză) găsită întîi în ouăle de Ascaris iar apoi la *Pasteurella pseudotuberculosis* tipul V.

Un studiu chimic amănunţit al polizaharizilor specifici a permis lui Kauffmann şi Westphal să grupeze salmonelele în „16 chemotipuri" după constituţia polizaharidului specific.

S-a constatat că indiferent de specificitate, toate variantele R ale salmonelelor posedă polizaharizi de acelaşi chemotip — cel mai simplu —

format din glucozamină, heptoză, galactoză şi manoză. La formele S pe lîngă zaharurile constitutive ale chemotipului cel mai simplu (R) se găsesc în plus alte unități de monozaharide ca de exemplu 3,6-didesoxihexozele.

De asemenea, trebuie să semnalăm prezența unei noi hexozamine descoperită în pereții celulari ai bacteriilor, este aşa-zisul „acid muramic" care nu există decît la aceste ființe şi la algele albastre.

Polizaharidele specifice au fost izolate la stafilococi, streptococi, meningococi, gonococi, bacilul cărbunelui, vibrioni etc. iar constituția lor chimică identificată.

Proteinele. Proteinele sînt componente esențiale ale tuturor celulelor vii şi în acelaşi timp printre cele mai complicate substanțe sintetizate de organisme.

Proteinele sînt macromolecule caracterizate prin faptul că deşi sînt formate prin unirea a mii de atomi, totuşi posedă o structură de bază relativ simplă. O proteină este de obicei formată dintr-un lanț polipeptidic (monomerul) adică dintr-un lung şir de unități care repetă o structură regulată şi la care sînt ataşate tot în mod regulat grupări laterale. Unitățile structurale ale monomerului sînt aminoacizi uniți între ei prin legături peptidice. Deşi pînă la ora actuală se cunosc peste 30 de tipuri de aminoacizi, totuşi în constituția proteinelor obişnuite nu se întîlnesc decît maximum 20. Monomerii se unesc pentru a forma polimerul macromolecular. Cercetările lui Sanger asupra secvențelor amino-acizilor în molecula insulinei au deschis calea pentru determinarea modului de înlănțuire a acestor unități în multe proteine animale, vegetale şi bacteriene.

Monomerul — sau mai mulți monomeri constituie aşa-zisa secvență de „prim ordin". Acest lanț se poate replia pentru a realiza structuri de „ordinul doi" care adesea iau forme helicoidale. Elicea de ordinul doi se poate replia la rîndul ei formînd o structură tridimensională de „ordinul trei". Această organizare structurală care are deci la bază o compoziție relativ simplă permite manifestarea pe de o parte a unei game variate de proprietăți şi pe de altă parte implică un mecanism de sinteză mai puțin complicat.

Studiul proteinelor microbiene prezintă o importanță deosebită în microbiologie. În afară de problemele legate de nutriție şi multiplicare, cercetarea naturii substanțelor proteice ale germenilor este esențială pentru lămurirea proprietăților genetice, antigenice, toxigene, fermentative, precum şi comportarea acestor ființe unicelulare față de dezinfectante antibiotice, substanțe chimioterapice.

Imunologia nu poate fi concepută fără cunoaşterea proprietăților acestor constituenți. Se ştie că specificitatea diferitelor clase de proteine este legată de natura, numărul şi poziția aminoacizilor constitutivi, precum şi de dispoziția reciprocă a acestor unități în macromolecula proteică.

Substanțele proteice se pot uni cu substanțele de altă natură chimică formînd complexe denumite „heteroproteine", care joacă roluri importante în fiziologia celulei. Astfel, prin unire cu acizii nucleici, dau naştere nucleoproteinelor care se găsesc în cantități particular de mari la bacterii. Glicoproteinele, lipoproteinele, cromoproteinele sînt de asemenea heteroproteine care se întîlnesc la microorganisme.

Proteinele reprezintă 40—80% din greutatea uscată a bacteriilor. Vîrsta culturii — varianta cercetată, precum şi bogăția mediilor de cultură în substanţe azotoase nutritive — natura acestor substanţe, fac să varieze în limite largi conţinutul celular în proteine.

Proteinele bacteriene sînt de tipul albuminelor, globulinelor, nucleoproteinelor şi al protaminelor. S-au descris albumoze, peptone, polipeptide, precum şi aminoacizi liberi — care reprezintă nu numai produse de degradare, dar şi substanţe care îndeplinesc, prin ele însele, roluri definite în celula microbiană.

În constituţia proteinelor bacteriene intră aceiaşi aminoacizi ca şi în proteinele plantelor şi animalelor. Totuşi, la bacterii s-au pus în evidenţă unii aminoacizi speciali, cum este, de pildă, acidul diaminopimelic, găsit în peretele celular la toate Eubacterialele, cu excepţia cocilor gram pozitivi.

Proteinele pe care unii germeni le secretă în mediul extern şi mai ales cele toxice pentru om şi animale au fost îndeosebi studiate de imunochimişti. Toxina difterică, tetanică, botulinică, toxina eritrogenă scarlatinoasă sînt substanţe de natură proteică care au fost cristalizate, iar proprietăţile lor fizico-chimice studiate în detaliu.

O serie de proteine secretate în mediu de către germeni îşi manifestă toxicitatea lor datorită activităţii enzimatice pe care o exercită. În această categorie intră „streptolizina'' sau „fibrinolizina'' produsă de unii streptococi (A şi C); „streptodornaza'', o enzimă nucleolitică produsă tot de această specie microbiană şi la care unele tipuri mai secretă încă şi două „hemotoxine'' (streptolizina O şi S). Particular de bogaţi în diverse enzime cu acţiune toxică sînt germenii din genul *Clostridium*. Ei secretă enzime care atacă colagenul, diverse alte ţesuturi, globulele roşii etc. „Hialuronidaza'', secretată de mulţi germeni (stafilococi, streptococi, clostridii), este o enzimă care depolimerizează substanţa fundamentală a ţesutului conjunctiv, permiţînd microorganismelor să străbată barierele naturale ale organismului, uşurîndu-le astfel invazia în corpul fiinţelor parazitate.

Bacilii tuberculozei secretă, de asemenea, proteine toxice, unele fiind responsabile de acţiunea tuberculinică.

La bacterii, ca la toate celulele vii, s-au evidenţiat existenţa de fracţiuni subcelulare (ribozomi) de natura mixtă, proteică şi nucleoproteică cu rol important în sinteza proteică. La nivelul lor are loc încorporarea aminoacizilor în moleculele proteice conform mesajului transmis de la ADN-ul nuclear, prin intermediul ARN-ului mesager (vezi cap. „Genetica bacteriană'').

Nucleoproteinele. Microorganismele sînt caracterizate printr-o mare bogăţie în nucleoproteine, iar studiul lor, în lumina noilor cercetări de citologie, citochimie bacteriană şi mai ales de genetică, a luat o deosebită importanţă care a depăşit cadrul strict al microbiologiei — aducînd însemnate contribuţii la biologia generală. În compoziţia nucleoproteinelor extrase din corpusculii cromatinici bacterieni sau aşa-zisului „nucleu'' s-a pus în evidenţă acidul dezoxiribonucleic (ADN), iar în protoplasma bacteriană ca în protoplasma tuturor celulelor s-a identificat o altă nucleoproteină, în constituţia căreia intră acidul ribonucleic (ARN) ca grupare prostetică.

Diferenţa între ADN şi ARN o constituie natura zaharului constitutiv. În ADN se găseşte desoxiriboză iar în ADN riboză.

Cantitatea de acizi nucleici variază, la microorganisme între 5 şi 25% din greutatea lor uscată, majoritatea însă conţin între 8 şi 10%. Ribonucleoproteinele sînt totdeauna în cantitate mai mare decît dezoxiribonucleoproteinele.

O serie de fapte experimentale au stabilit neîndoielnic că structura genelor este alcătuită din acizi nucleici de tipul ADN-ului. Genele sînt unităţile funcţionale genetice şi sînt dispuse liniar în cromozomi. Filamentele de cromozomi se prezintă la bacterii sub forma unui ghem constituind aşa-numiţii corpusculi cromatinici echivalenţi funcţional nucleului fiinţelor superioare. Spre deosebire însă, aşa-zisul nucleu bacterian nu are membrană care să-l delimiteze de citoplasmă, ci vine direct în contact cu ea.

ADN-ul este un polimer format din alternanţa acidului fosforic şi a unui zahar desoxiriboza. La fiecare moleculă de zahar este ataşat lateral o bază organică. Varietatea acestor baze este mică, sînt numai 4 (două baze purinice şi două pirimidinice respectiv adenina, guanina, timina şi citozina pentru ADN şi pentru ARN în loc de timină, uracil).

În macromolecula ADN-ului ele se succed în anumită ordine şi astăzi se atribuie modului lor de înşiruire capacitatea de a imprima „codul genetic" (vezi cap. „Genetica bacteriană").

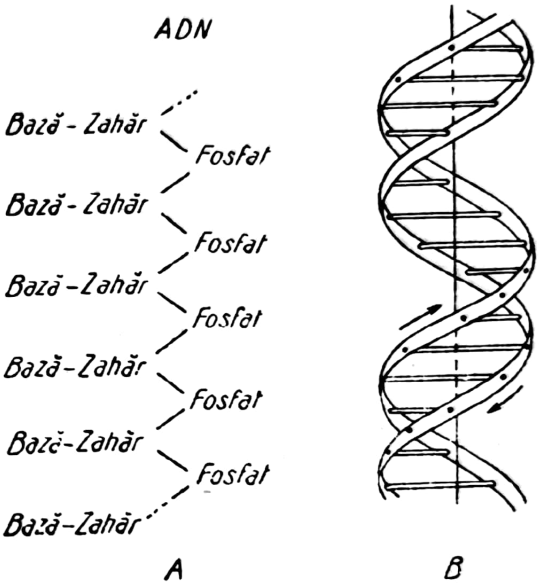


Fig. 35. — *A* — formula generală a unui lanţ de polinucleotizi. *B* — reprezentarea după Watson şi Crick a elicei duble de ADN formată din 2 lanţuri de A care sînt legate între ele prin punţi de hidrogen care unesc fiecare bază a primului lanţ cu baza vecină a celui de al doilea lanţ (liniile orizontale).

Watson şi Crick au propus o schemă structurală a ADN-ului pe baza cercetărilor fizico-chimice efectuate. În această schemă, molecula de ADN (polinucleotidul) reprezintă un lanţ dublu răsucit elicoidal în care bazele laterale ale fiecărui lanţ se unesc în perechi prin punţi de hidrogen, formînd o structură asemănătoare treptelor unei scări în spirală. Punţile de hidrogen care unesc aceste baze juxtapuse — pentru raţiuni de ordin steric — nu se formează la întîmplare ci numai între perechile adenină-timină şi guanină-citozină. În fiecare genă se află aproximativ o serie de perechi de baze şi ordinul în care se succed determină secvenţa celor 20 de aminoacizi în proteina a cărui sinteză o comandă.

Această sinteză nu are însă loc în nucleu ci în protoplasmă în nişte particule denumite „ribozomi" constituite din părţi egale de proteină şi ARN. Cercetările recente au arătat că la sinteză proteică contribuie cel puţin doi ARN. Unul din ei sintetizat în nucleu — denumit ARN mesager — transmite ribozomului informaţia primită de la ADN, celălalt ARN denumit de transfer, leagă specific acizi aminaţi, care se unesc între ei sub comanda ARN-ului mesager pentru a forma proteina specifică.

Componenţii azotoşi cu moleculă mică ai celulei bacteriene. Nu tot azotul celulei bacteriene este de natură proteică ; aceste fiinţe au un conţinut important în compuşi azotoşi cu moleculă mică, care pot fi extraşi prin tratarea celulei cu agenţi deproteinizanţi (de exemplu, acidul tricloracetic precipită proteinele, iar din corpul celular difuzează substanţele acidosolubile cu moleculă mică, printre care se află şi compuşii azotului).

Din azotul total bacterian (8—14 % din greutatea uscată), după specia considerată, 5—17 % este azot acidosolubil. În această cantitate, majoritatea revine polipeptidelor cu moleculă mică, aminoacizilor liberi şi azotului amoniacal. Tot în această fracţiune intră nucleotidele, nucleozidele, precum şi bazele purinice şi pirimidinice, ele reprezentînd, atît produse de catabolism ale acizilor nucleici, cît şi substanţe care prin ele însele joacă un rol definit în fiziologia celulară. Astfel, unele nucleotide bacteriene reprezintă gruparea prostetică (coenzima) a unor fermenţi (exemplu : adenin-nicotinamid-dinucleotid ; adenin-riboflavin-dinucleotid ; tiamindifosfat).

O deosebită atenţie s-a dat, în ultimii ani, studiului necesităţilor germenilor în aminoacizi, ajungîndu-se la formularea de medii sintetice, în care substanţele proteice complexe sînt înlocuite prin aminoacizii strict necesari dezvoltării germenului respectiv. Aminoacizii au putut fi astfel separaţi în două categorii : cei esenţiali şi cei neesenţiali nutriţiei anumitor specii. Aminoacizii esenţiali sînt cei pe care celula bacteriană nu-i poate sintetiza şi, în consecinţă, trebuie să-i găsească preformaţi în mediul de cultură.

O dată cu izolarea diverselor entităţi morfologice ale celulei microbiene s-a putut analiza şi natura lor chimică. Astfel, spre exemplu, s-a arătat că flagelii bacterieni sînt constituiţi din proteine fibrilare ; s-a analizat conţinutul în aminoacizi al membranelor celulare şi s-au relevat diferenţe calitative importante între aminoacizii proveniţi din membranele bacteriilor gram pozitive şi cele gram negative etc.

Lipidele. Lipidele bacteriene sînt reprezentate prin totalitatea substanţelor solubile în aşa-zişii solvenţi ai grăsimilor, ca eterul, acetona, cloroformul şi petrolul. În această grupă de constituenţi celulari se studiază grăsimile neutre, cerurile, sterolii, fosfatidele şi acizii graşi. De asemenea, tot în acest capitol se studiază şi diversele produse rezultate din hidroliza acestor componente, cum sînt alcoolii inferiori şi superiori, glucidele şi diversele baze azotoase.

Cantitatea lipidelor variază la diversele specii microbiene, iar la aceeaşi specie variază cu compoziţia mediului de cultură şi cu vîrsta celulei.

Mediile bogate în glicerol sau zaharuri dau culturi microbiene cu un conţinut ridicat în materii grase. De asemenea, s-a constatat că, pe măsură ce celula bacteriană îmbătrîneşte, cantitatea lipidelor creşte, fapt care se interpretează ca un semn de degenerescenţă.

Temperatura de incubare a culturii face să varieze conţinutul şi natura lipidelor. Astfel, s-a demonstrat că gradul de saturare a grăsimilor la bacilul coli creşte pe măsură ce se ridică temperatura la care se cultivă germenul. Acest fapt se încadrează într-o lege biologică generală, după care atît plantele, cît şi animalele care trăiesc la temperaturi mai înalte au în ţesuturi grăsimi mai saturate decît cele care trăiesc la temperaturi joase.

Dacă se exceptează bacteriile acidorezistente, al căror conţinut în lipide poate atinge 40% din greutatea uscată a germenului, restul bacteriilor conţin cantităţi care rareori depăşesc 10%.

O deosebită atenţie s-a dat în ultimul timp naturii şi proprietăţilor lipidelor care intră în constituţia endotoxinelor germenilor gram negativi. Aceste endotoxine, glucido-lipido-polipeptidice, declanşează la animalele de experienţă o serie de fenomene care au fost atribuite lipidului A din constituţia lor (toxicitate, mărirea rezistenţei nespecifice a organismului faţă de diferite infecţii, capacitatea de a necroza tumorile, pirogenitate).

Lipidele micobacteriilor au fost îndeosebi cercetate de către chimişti şi microbiologi, datorită rolului pe care îl joacă în interacţiunea germenului cu gazda.

Acizi graşi. La micobacterii au fost puşi în evidenţă acizi graşi obişnuiţi (butiric, palmitic, stearic, linoleic etc.) şi acizi graşi speciali ca acidul ftioic (responsabil, după cît se pare, de formarea tuberculilor), acidul tuberculostearic (cu acţiune iritativă), acidul micolic (un oxiacid care imprimă celulei caracterul de acidorezistenţă). La *Pseudomonas aeruginosa* s-au descris acizii : butiric, caproic, oleic, palmitic, stearic şi arahidic.

Grăsimi neutre. Au fost studiate în particular tot la micobacterii, constatîndu-se că se deosebesc de cele izolate de la plante şi animale, prin faptul că acizii graşi nu sînt uniţi cu glicerina, ci cu un dizaharid : trehaloza.

Substanţele ceroase la micobacterii ating 5—10% din greutatea uscată a germenului. Esterificarea acizilor graşi are loc la aceste substanţe cu alcooli de greutate moleculară mare. Unii alcooli care intră în compoziţia cerurilor bacteriene au fost identificaţi ca, de exemplu, la bacilul difteric, alcoolul corinic (Gubarev şi Vakulenko, 1945).

Speciile microbiene care nu sînt acido-alcoolorezistente conţin cantităţi mici de material ceros (*Corynebacterium diphtheriae* 0,3%; *Phytomonas tumefaciens* 0,8%).

Fosfolipidele sînt complexe formate dintr-un acid gras, un alcool, o bază azotoasă şi acid fosforic. Ele au fost descrise la cea mai mare parte a bacteriilor iar la enterobacteriacee, la brucele şi alte specii fosfolipidele reprezintă peste 50% din cantitatea totală de lipide a celulei.

Interesant este faptul că la plante şi animale există un raport bine definit între cantitatea de N şi P eliberată prin hidroliza fosfolipidelor, raport care serveşte la clasificarea acestor substanţe. La bacterii însă, aceste corelaţii nu pot fi stabilite, deoarece cantitatea de N din fosfolipide este mult mai mică decît cea de P, iar bazele azotoase sînt diferite ca natură chimică.

Sterolii, deşi intră în compoziţia lipidelor extrase din drojdii şi mucegaiuri, prezenţa lor la bacterii este încă discutată.

Pigmenţii bacterieni. Elaborarea de pigmenţi este o proprietate a multor celule bacteriene, în special aerobe.

Pigmentogeneza este însă dependentă de condiţiile de cultivare, în general mediile solide fiind mai favorabile decît cele lichide. Dintre elementele necesare formării tuturor pigmenţilor este azotul, dar în anumite cazuri este necesară prezenţa de elemente speciale în mediu ca, de exemplu : Mg utilizat la sinteza bacterioclorofilelor, Fe la sinteza prodigiosinei, a pigmentului secretat de *Serratia marcescens* sau piocianinei, pigmentul bacilului piocianic. Sărurile minerale, reacţia mediului, sursa de carbon, temperatura, cantitatea de oxigen, lumina au rol foarte important în elaborarea acestor substanțe.

Pigmenții bacterieni sînt clasificați după natura lor chimică. Astfel:

a) *pigmenții carotinoizi*, de culoare roșie, portocalie sau galbenă, au fost izolați de la sarcine, stafilococi, micrococi, micobacterii;

b) *pigmenții chinonici*, de culoare galbenă, izolați la micobacterii (ftiocolul);

c) *pigmenții melanici*, de culoare neagră sau brună, au fost izolați la *Azotobacter*, bacilul mezenteric;

d) *pigmenții pirolici*, de tipul bacterioclorofilei și prodigiozinei;

e) *pigmenții fenazinici* sînt reprezentați prin piocianină (de la *Pseudomonas aeruginosa*).

Unii pigmenți sînt solubili în mediul de cultură (piocianina), pe cînd alții sînt legați de celula microbiană. Este de semnalat că rolul pigmenților în fiziologia microbiană nu a fost încă lămurit, deoarece există variante pigmentate și nepigmentate la aceeași specie și al căror metabolism se desfășoară asemănător.

Factorii de creștere sintetizați de bacterii

S-a constatat că deși unor microorganisme li se furnizează cantități suficiente de aminoacizi, glucoză, săruri minerale și condiții fizice (t° și pH) optime, totuși ele nu se pot dezvolta pe medii sintetice decît dacă li se adaugă cantități extrem de mici de anumite substanțe organice, care au fost denumite „factori de creștere" sau „vitamine" microbiene.

Unele bacterii însă sînt capabile de a sintetiza aceste substanțe și chiar uneori în cantități atît de mari, încît servesc ca materie primă la extragerea diverselor vitamine. Asupra rolului acestor substanțe vom reveni la capitolul de „nutriție bacteriană".

Vom cita aci unele vitamine care sînt sintetizate de bacterii: astfel, *biotina* este sintetizată de *Proteus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *B. subtilis*, *Esch. coli*, *B. anthracis*, *Pseudomonas*, *Serratia* și îndeplinește în celulă rolul de coenzimă în unele sisteme fermentative.

Acidul pantotenic este găsit la multe bacterii ca și *riboflavina*, acești doi factori de creștere intrînd în lanțul reacțiilor din metabolismul celular. *Tiamina* (vitamina B_1) este sintetizată de *Esch. coli*, *B. subtilis*, *B. mycoides*, *S. typhi*, *Shigella* și *C. diphtheriae*. *Piridoxina* (vitamina B_6) este sintetizată de unii lactobacili, iar *acidul nicotinic* de numeroase bacterii etc.

Necesitatea bacteriilor în diverși factori de creștere pe care nu-i pot sintetiza este satisfăcută de ingredientele care compun mediile de cultură, ca extracte de carne, de drojdie, sînge etc.

Antibiotice sintetizate de bacterii

Trebuie să semnalăm că există bacterii care, întocmai ca și mucegaiurile sînt capabile să secrete o serie de substanțe care au efect antagonist asupra dezvoltării altor specii de germeni. Aceste produse bacteriene sînt în marea lor majoritate polipeptide.

Gramicidina (Dubos), *gramicidina sovietică şi tirocidina* sînt produse de o bacterie sporulată din sol. În această categorie intră şi polimixinele, apoi bacitracina şi subtilina produse de *B. subtilis.*

Pigmentul secretat de bacilul piocianic este de asemenea bacteriostatic pentru o serie de germeni grampozitivi şi gramnegativi.

Proprietăţile fizico-chimice ale bacteriilor

Totalitatea fenomenelor fizico-chimice care au loc în celula bacteriană sînt dependente de specia şi de varianta considerată, de vîrsta microorganismului în momentul observaţiei, precum şi de compoziţia şi proprietăţile mediului ambiant.

Date fiind dimensiunile reduse ale celulei bacteriene suprafaţa lor faţă de volum este considerabilă. Astfel s-a calculat că o suspensie de 1 miliard de *S. typhi* într-un mililitru prezintă o suprafaţă totală de 30 cm^2. Această cifră ne poate explica de ce fenomenele de suprafaţă au o intensitate şi o importanţă atît de mare la bacterii.

Ordinea de mărime a bacteriilor este în medie de un micron ; această talie însă este variabilă cu specia şi vîrsta celulei. Compoziţia mediului este un factor important ; de altfel, se ştie că anumite substanţe incluse sînt capabile de a produce o variaţie în mărimea celulară sau de a favoriza dispunerea celulelor în filamente mai mult sau mai puţin alungite (ex : Mg^{++}).

Mişcarea browniană este o proprietate a celulelor bacteriene imobile (lipsite de flagele). Ea este caracterizată prin deplasări dezordonate, în zigzag, ale celulelor, fenomen care se poate observa la microscop în cîmp întunecat dacă suspensia este făcută în lichide nevîscoase. Această mişcare, observată pentru prima oară, în 1928, de Brown la granulele de polen, nu este specifică numai bacteriilor, ci tuturor particulelor vii sau moarte care nu întrec ca dimensiune 4μ. Cauza acestei mişcări rezidă în faptul că moleculele mediului, în perpetuă mişcare, ciocnesc faza dispersă în mod continuu, imprimîndu-i aceste mişcări caracteristice.

La bacterii s-au calculat diverse constante fizico-chimice. Astfel, s-a putut stabili *indicele de refracţie* al multor specii, suspendîndu-se bacteriile în medii cu indici de refracţie cunoscuţi. În momentul cînd indicele de refracţie al mediului este identic cu cel al germenului, acesta devine invizibil la microscop.

De asemenea, *greutatea specifică* şi *viscozitatea* au fost determinate cu metodele cunoscute în chimia fizică. O caracteristică specială a celulei microbiene este *elasticitatea membranei celulare.*

În general s-a constatat că bacteriile sînt foarte rezistente la presiune, tensiune şi torsiune, calităţi care au fost relevate prin microdisecţia celulelor. Însuşi faptul că anumite bacterii trăiesc în regiunile abisale arată rezistenţa lor la presiuni enorme. De altfel, şi experimental s-a pus în evidenţă că unele specii, cum sînt de pildă salmonelele, rezistă la presiuni hidrostatice de 4 500 kg/cm^2, fără ca dezvoltarea lor ulterioară, ca şi structura antigenică, să sufere modificări.

Încărcătura electrică a suprafeţei bacteriilor

Existenţa, natura şi intensitatea sarcinii electrice a bacteriilor se pot pune în evidenţă prin viteza lor de transport în cîmp electric. S-a constatat că în condiţii normale de cultură şi la un pH neutru bacteriile au o încărcătură negativă (migrează spre anod), spre deosebire de spirochete, care au încărcătură pozitivă (migrează spre catod).

Studiul încărcăturii electrice a bacteriilor oglindeşte natura chimică a suprafeţelor celulare, a stratului mucoid sau a membranei externe.

Originea încărcăturii electrice este datorită, pe de o parte, disocierii substanţelor care intră în constituţia stratului periferic al microorganismului, şi pe de altă parte, adsorbţiei de ioni din mediul extern.

Concentraţia ionică a mediului în care germenii sînt suspensionaţi are o influenţă considerabilă asupra încărcăturii electrice. În general, bacteriile într-un mediu cu pH neutru şi datorită grupărilor chimice amfotere de la suprafaţă au un punct izoelectric situat la pH acid, fapt care le determină încărcătura negativă la pH neutru. Caracteristic este faptul că vîrsta culturii face să varieze încărcătura electrică a bacteriilor; astfel, în primele stadii de cultură mobilitatea electroforetică scade la minimum. Ea începe să se ridice treptat în cursul fazei de multiplicare activă, rămînînd maximă în faza staţionară a ciclului de dezvoltare.

Aglutinarea nespecifică a suspensiilor bacteriene

În tehnica microbiologică se observă în mod curent că anumite specii microbiene tulbură omogen mediile de cultură lichide, pe cînd alte specii sau variante ale aceleiaşi specii cresc sedimentat (de exemplu variantele rugoase), lăsînd mediul supernatant clar. Acest fenomen a fost studiat prin metode fizico-chimice şi s-a ajuns la concluzia că stabilitatea suspensiilor bacteriene este generată de gradul de hidratare a grupărilor chimice ionizate şi neionizate de la suprafaţa bacteriilor, de cantitatea de ioni adsorbiţi din mediul şi de sarcina electrică a germenului.

Trecerea bacteriilor prin filtre poroase

În acest fenomen intervine, de asemenea, încărcătura electrică a suprafeţelor bacteriene. Cercetarea sa este importantă nu numai sub aspectul practic, anume posibilitatea de a steriliza prin filtrare lichidele infectate, dar şi din punct de vedere teoretic. Astfel, cunoscînd dimensiunea porilor unui filtru se poate măsura dimensiunea germenilor care îi străbat la limită. Prin variaţia încărcăturii electrice a bacteriilor, anumiţi germeni filtrabili pot deveni nefiltrabili, sau viceversa. Ca principiu, particule cu dimensiuni filtrabile, dacă au încărcătură de semn contrar filtrului, nu vor putea trece prin porii săi, deoarece sînt reţinute prin atracţie electrică.

Potențialul de oxidoreducere al celulelor bacteriene

Se știe că oxidarea este un proces în care există o pierdere de electroni, pe cînd reducerea implică un cîștig de electroni, și că un fenomen de oxidare este totdeauna însoțit de unul de reducere.

În toate celulele există nenumărate sisteme oxidoreductoare care joacă un rol extrem de important în procesele metabolice și energetice, astfel încît unii autori au definit viața ca : „o reacție continuă de oxidoreducere".

Trebuie însă specificat că studiul acestor fenomene, în cazul bacteriilor, nu se face pe celula însăși ci pe cultura totală, adică simultan pe mediu și bacterii. Determinările se fac, fie electrometric, fie cu ajutorul indicatorilor, a căror culoare variază cu schimbarea potențialului de oxidoreducere. Acesta este exprimat în volți și notat convențional cu „Eh", simbol care, într-un anumit moment, reprezintă un indice al echilibrului de oxidoreducere al tuturor sistemelor care activează în celulă.

În mod normal „Eh" la un mediu obișnuit este cuprins între + 0,2 și + 0,4 v. la pH neutru. Dacă din mediu se elimină O_2, de pildă prin încălzire, sau se adaugă substanțe reductoare, atunci Eh scade și bacteriile aerobe nu se vor mai putea dezvolta în asemenea mediu. Pe de altă parte, microorganismele anaerobe își încetează dezvoltarea la un Eh superior mai mare de + 0,2 volți, din care cauză eliminarea oxigenului sau adăugarea de substanțe reductoare sînt absolut necesare pentru crearea condițiilor de anaerobioză necesare acestor bacterii.

Permeabilitatea celulei microbiene

Atît hrana din mediul înconjurător, cît și produsele de deșeu ale metabolismului microbian străbat membranele (membrana celulară și membrana citoplasmatică) celulei bacteriene. Una din caracteristicile acestor învelișuri este selectivitatea. Datorită acestei calități, germenii în contact permanent cu mediul înconjurător — ca să-și poată menține viața — împiedică pătrunderea substanțelor nocive, absorb numai pe cele hrănitoare și excretă totodată produsele de deșeu rezultate din metabolism.

O serie de teorii au fost elaborate pentu explicarea fenomenului de permeabilitate selectivă a membranelor celulare, din care unele au numai un interes istoric. Pentru explicarea repartiției inegale a ionilor de o parte și de alta a acestor învelișuri, s-a emis ipoteza că ar interveni potențialul de membrană (echilibrul lui Donnan). Conform acestei teorii pentru a se atinge neutralitatea electrică de o parte și de alta a membranei este necesară o repartiție inegală a ionilor difuzibili, pentru a compensa sarcinile electrice ale ionilor nedifuzibili. Dacă acestă teorie ar putea să explice cauzele traversării membranelor celulare de către anumite substanțe, totuși nu poate cuprinde toate aspectele procesului fiziologic de permeabilitate selectivă.

Cercetări recente au ajuns la elaborarea unor noi concepții privind transportul anumitor substanțe prin membrane și care, pentru o serie de produși nutritivi, a fost verificată.

Această nouă teorie arată că transportul prin membrană se datorește unor grupări biochimic active, localizate în această entitate morfologică. Acestor grupări li s-a dat denumirea de *translocaze* sau *permeaze*, iar fenomenul de străbatere a substanțelor prin membrane s-a denumit „translocație" sau „permeație", atribuindu-i-se o natură enzimatică.

Transferul substanțelor din exterior în interiorul celulei, sau viceversa s-ar face datorită mișcărilor electronice pe care grupările active le suferă și care fac ca ele să vină în contact, în mod alternativ, cu mediul ambiant sau cu mediul intern celular, legînd sau eliberînd substanțele care trebuie ingerate sau excretate.

Astfel, se știe că acumularea acidului glutamic în celulele germenilor grampozitivi se face cu cheltuială de energie, care se obține prin metabolizarea concomitentă a glucozei. Această constatare a făcut necesară admiterea noțiunii de „transfer activ". Cu alte cuvinte, fiind necesară energie în fenomenul de transport, rezultă că au loc procese enzimatice (proces activ).

În literatură se găsesc citate o serie de exemple relativ la transportul activ și al altor substanțe. Totuși trebuie semnalat că nu în toate cazurile transportul prin membrană necesită cheltuială de energie. Astfel, s-a constatat că aminoacidul lizina este încorporat fără metabolizarea concomitentă a glucozei; în acest caz nu există un transport activ, astfel încît s-ar putea ca în anumite cazuri să intervină echilibrul Donnan, despre care s-a vorbit.

Presiunea osmotică

Presiunea osmotică a celulei bacteriene se măsoară prin suspendarea sa în lichide cu presiuni osmotice cunoscute. Lichidul care nu provoacă plasmoliza celulară are o presiune osmotică egală cu a germenului. Presiunea osmotică internă a bacteriilor variază foarte mult cu vîrsta celulară, cu concentrația în electroliți sau cu mediul. Astfel, o cultură de *Esch. coli* în vîrstă de 17 ore are o presiune internă de 9 atmosfere, dacă este cultivată în mediu glucozat 1%; prin diluția mediului 1 :4, scade însă la 4 atmosfere. Presiunea osmotică la culturile de 2 ore este și mai considerabilă, putînd atinge 25 atmosfere. Aceasta face ca membrana citoplasmatică a celulei să fie împinsă și să adere de peretele celular extern, care are calități de rezistență cu totul speciale.

Dacă celula bacteriană este suspendată într-un mediu hipertonic se poate observa o turgescență mărită, care poate evolua pînă la spargerea celulei, datorită marii presiuni osmotice interne. Acest fenomen se numește *plasmoptysis*.

Bacteriile care suportă presiuni osmotice mari se numesc *osmofile*, iar ca exemplu tipic în această grupă intră bacteriile halofile, care trăiesc în medii cu concentrații mari de săruri (20% NaCl).

Adsorbţia şi absorbţia ionilor de către bacterii

S-a arătat că bacteriile, datorită dimensiunilor lor reduse, au o suprafaţă considerabilă faţă de volum, deci şi fenomenele de adsorbţie — care sînt fenomene de suprafaţă — vor fi foarte intense la aceste fiinţe. Migrarea bacteriilor în cîmp electric, filtrabilitatea, aglutinarea prin acizi, caracterele tinctoriale sînt guvernate de fenomenele de adsorbţie.

Absorbţia, pătrunderea diverselor substanţe în interiorul celulei, am văzut că este dependentă de caracterul de semipermeabilitate al membranelor celulare. Se cunoaşte de mult influenţa diferiţilor ioni asupra permeabilităţii celulare; atît cationii, cît şi anionii au fost aranjaţi în anumită ordine, care arată gradul lor de acţiune asupra acestui fenomen (Hofmeister). Utilizarea izotopilor radioactivi a adus importante contribuţii la studiul absorbţiei diferiţilor ioni de către celula microbiană. Dintre aceste studii trebuie subliniat cazul sodiului, care s-a dovedit că este absorbit de celulă, independent de metabolismul său şi în consecinţă, prin spălarea suficientă a celulei se poate îndepărta complet, fără ca funcţiile vitale ale celulei să sufere. Nu acelaşi este cazul potasiului care intervine în multe procese fiziologice importante, cum este de exemplu metabolismul glucozei.

Studiile de absorbţie s-au făcut o dată cu cercetările de permeabilitate a membranelor şi acestea au condus, după cum s-a arătat pentru o serie de aminoacizi şi metale, lá noţiunea de transfer activ (enzimatic).

Datorită faptului că bacteriile au sarcină negativă, ele pot absorbi şi adsorbi cationii din mediu.

Diferite cercetări au arătat că intensitatea cu care sînt adsorbiţi şi absorbiţi anumiţi ioni urmează anumite legi, şi ele sînt variabile în funcţie de pH al mediului înconjurător. În general, s-a demonstrat că ionii care se fixează mai intens pe celulă sînt totodată şi cei mai toxici (Ag^{++}, Hg^{++}).

Celula bacteriană manifestă o serie de alte fenomene fizico-chimice, cum ar fi de exemplu caracterele de „muiabilitate”, care indică natura chimică a substanţelor ce se află la exteriorul celulei. Astfel, bacilii tuberculozei — deosebit de bogaţi în substanţe lipidice la exteriorul celulei — nu se lasă muiaţi de lichide apoase, iar la interfaţa a două lichide nemiscibile bacilii vor fi muiaţi de faza în care se dizolvă grăsimile.

O altă manifestare a anumitor specii bacteriene, mai ales marine, este „ luminişcenţa”. Aceste bacterii nu sînt însă patogene pentru om şi animale. Reacţia enzimatică care produce energie luminoasă pe seama substratului (luciferina) este identică, ca mecanism, cu cea descrisă la *Cypridine*, insecte etc.

Enzimele bacteriene

Enzimele sînt biocatalizatori de natură proteică ai reacţiilor chimice care au loc în sînul materiei vii. Microorganismele posedă un echipament enzimatic foarte activ, graţie căruia se îndeplineşte în natură completarea „ciclurilor” pe care elementele chimice biogene (C,N, P, S etc.) le parcurg la suprafaţa globului terestru.

Prin activitatea lor enzimatică, microorganismele descompun substanţele organice complexe pînă la produşi simpli, care sub această formă pot fi din nou asimilaţi de către plante şi animale. Practic, se poate spune că nu există materie organică care să nu fie atacată de enzimele microorganismelor.

Pentru a ilustra ordinea de mărime a metabolismului microbian, catalizat de enzime, Gale arată că pe cînd o celulă hepatică consumă oxigen echivalent cu un indice arbitrar cuprins între 2 şi 5, o celulă de *Esch. coli* are acelaşi indice cuprins între 100 şi 300, *Acetobacter* de aproximativ 1000, iar *Azotobacter* 3000.

Enzimele tuturor celulelor sînt caracterizate printr-o serie de calităţi, dintre care specificitatea este cea mai remarcabilă. Astfel, deşi există o serie întreagă de enzime care realizează procese chimice similare — hidroliză de exemplu — totuşi fiecare enzimă de acest tip nu acţionează decît asupra unui substrat definit. În acest mod hidroliza zaharozei va fi realizată de o enzimă specială şi diferită de cea care hidrolizează lactoza, maltoza etc.

Pentru ca activitatea enzimatică să se poată desfăşura în condiţii optime, sînt necesare un ansamblu de condiţii fizico-chimice ca : temperatura, pH, concentraţie optimă de substrat şi enzimă, diverse substanţe stimulante etc. ; toate aceste caracteristici sînt descrise în orice manual de biochimie, iar noţiunile generale sînt valabile întru totul şi pentru cazul enzimelor bacteriene.

În ceea ce priveşte clasificarea enzimelor s-au propus mai multe criterii, şi anume :

1. După *compoziţia chimică*, enzimele se împart în :

a) ***Holoproteine*** : sînt proteine pure, ca : pepsina, tripsina, ureaza etc.

b) ***Metaloproteine*** : sînt holoproteine cuplate cu un metal, ca : enolaza (Mn), anhidraza (Zn), catecholoxidaza (Cu).

c) ***Heteroproteinele*** sînt holoproteine cuplate cu derivaţi ai hemului ca : peroxidaza, catalaza, citocromoxidaza.

d) ***Enzime cu coenzime*** sînt holoproteine cuplate cu substanţe de natură nemetalică. Legătura enzimă-coenzimă este, de obicei, laxă, acestea putînd fi separate prin mijloace fizico-chimice blînde (de exemplu, coenzima poate fi separată de proteină prin dializă deoarece, avînd moleculă mică, traversează membranele semipermeabile).

2. Din punct de vedere al *procesului chimic*, pe care enzimele îl realizează, ele se pot împărţi în două mari grupe :

a) ***Hidrolazele*** sînt enzimele care au la bază un proces hidrolitic. Desfacerea sau sinteza se realizează prin pierderea sau fixarea unei molecule de apă ; de exemplu, esterazele (lipaza, fosfataza), carbohidrazele, proteazele etc. Ele catalizează desfacerea legăturilor secundare între C şi O sau C şi N, iar cantitatea de energie eliberată este mică (de exemplu, lipaza eliberează 4 kilocalorii pe gram de substrat hidrolizat).

b) ***Desmolazele*** sînt enzime care desfac legăturile dintre lanţurile de atomi de carbon (—C—C—). Ele sînt enzime care catalizează procesele de oxidoreducere, ca : oxidazele, dehidrogenazele, peroxidazele, catalazele. De obicei sînt enzime intracelulare, iar prin activitatea lor se eliberează mari cantităţi de energie. De pildă, oxidaza bacteriilor acetice eliberează 2 530 kilocalorii dintr-un gram de substrat atacat. Prin activitatea desmolazelor se obține energia necesară metabolismului celular.

3. În sfîrşit, a treia clasificare a fost impusă de *condițiile apariției enzimelor* în celulă şi ea este caracteristică numai microorganismelor. La aceste ființe Karstörm a descris două clase:

a) *Enzime constitutive* sînt acelea care se găsesc în mod permanent în celulă, oricare ar fi condițiile de cultură, atît în prezența, cît şi în absența substratului respectiv. În această grupă intră lipazele, carbohidrazele, proteinazele, oxidazele etc.

b) *Enzime adaptative*: enzime care nu apar decît atunci cînd în mediul de cultură se găseşte substratul respectiv.

Gale, făcînd studii cantitative asupra „enzimelor adaptative" la unii germeni, a reuşit să demonstreze că în realitate, sub denumirea de enzime adaptative trebuie să se distingă două procese a căror natură este diferită.

Enzimele adaptative propriu-zise sînt formate în mică cantitate, chiar atunci cînd dezvoltarea bacteriei are loc în absența substratului. Prezența substratului respectiv în mediul de cultură aduce însă după sine o stimulare a formării enzimei. În acest caz, adaptarea se face foarte rapid. De pildă, galactozimaza apare după o singură trecere a germenilor pe mediu cu galactoză, după cum o singură cultură fără acest substrat face să cadă considerabil conținutul acestei enzime (vezi grafic „adaptare") (fig. 36).

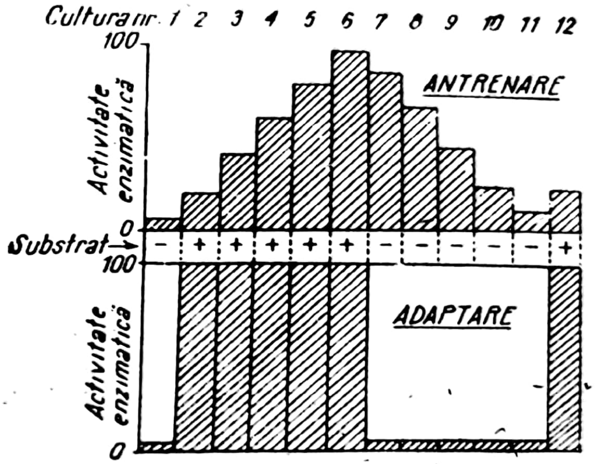


Fig. 36. — Diferența dintre „adaptare" şi „antrenare" în procesul de formare a enzimelor (Gale).

Există şi un alt tip de adaptare, care a fost studiat la *Esch. coli mutabile*. S-a constatat că fermentarea lactozei la aceste tulpini se instalează lent, în trepte, necesitînd mai multe subculturi în serie. În acest caz s-a arătat că există o variație în permeabilitatea celulară față de substrat (lactoza). Microorganismul posedă întreg potențialul enzimatic format (este în realitate o enzimă constitutivă), dar substratul rămîne nehidrolizat, din cauza impermeabilității membranei, care opreşte difuziunea lactozei. Cultivarea continuă în prezența acestui substrat duce la o sporire a permeabilității sau, poate, la o selecție a unor celule preexistente, cu permeabilitate mărită față de această substanță. Acest gen de adaptare s-a numit „antrenare" şi este bazat pe principiul creşterii selective a celulelor mai bine dotate pentru a tolera condițiile nou create prin prezența unei anumite substanțe în mediu.

În general, majoritatea enzimelor constitutive ale celulelor sînt răspunzătoare de procesele respiratorii şi sintetice, pe cînd enzimele adaptative sînt „hidrolaze" care desfac substratul pînă la un stadiu în care este mai uşor atacat de enzimele constitutive.

La al V-lea Congres de biochimie (1961) s-a hotărît să se folosească termenul de ,,enzimă inductivă'' în loc de ,,enzimă adaptativă'' deoarece procesul unei noi sinteze enzimatice are la bază un mecanism de inducţie.

De asemenea, a fost adoptată oficial clasificarea enzimelor după natura procesului catalizat. Astfel cele peste 700 de enzime cunoscute au fost grupate în 6 clase : oxidoreductaze, transferaze, hidrolaze, ligaze, izomeraze şi ligaze.

Vom trece în revistă o serie de enzime, atît din grupa hidrolazelor, cît şi a desmolazelor, care au fost cercetate în mod special la microorganisme.

Hidrolaze :

1. *Esteraze*. În această grupă intră :

a) *lipazele*, care hidrolizează grăsimile neutre în glicerină şi acizi graşi. Ele pot fi endocelulare, ca la *Esch. coli*, pneumococ, *Cl. perfringens*, *B.anthracis* etc., sau extracelulare (secretate în mediul de cultură), ca la *Cl.botulinum*, stafilococ etc. ;

b) *fosfatazele* sînt enzime care clivează fosfaţii din diverse combinaţii. Ele sînt clasificate, după substratul pe care îl atacă, în : fosfomonoesteraze, fosfodiesteraze, pirofosfataze, metafosfataze, fosfoamidaze.

Caracteristica acestor enzime este vasta lor răspîndire în natură, găsindu-se la toate microorganismele, în diverse organe şi aproape în toate ţesuturile animale. La bacterii, cel mai mult au fost studiate fosfomonoesterazele, pirofosfatazele şi fosfodiesterazele. Acestea din urmă sînt enzime de tipul lecitinazei, care atacă lecitina, eliberînd acizi graşi, glicerol şi fosfocalină. A fost studiată în special la *Cl. perfringens* deoarece toxina acestui germen este asociată cu capacitatea lecitinazică.

S-a descris de asmenea la *B. subtilis*, *B. mycoides*, *Proteus*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. typhi* ca şi la bacilii acidorezistenţi.

2. *Carbohidrazele* sînt enzime care hidrolizează carbohidraţii. Această grupă de enzime este studiată în mod particular la microorganizme, deoarece reacţiile pe care le catalizează servesc la indentificarea multor specii microbiene, după cum se va constata în manualul de faţă.

În această categorie intră *amilaza*, enzimă care hidrolizează amidonul şi care a fost descrisă la mulţi germeni ca *B. anthracis*, *B. subiilis*, *B. megatherium*, *Vibrio comma*, *Ps. aeruginosa*, *Cl. perfringens*, *Esch. coli*, unii streptococi patogeni etc. În natură se întîlnesc microorganisme saprofite a căror putere fermentativă asupra amidonului este folosită în diverse industrii.

Pectinazele sînt enzime care hidrolizează diverse pectine. Ele au fost puse în evidenţă la enterococi, micrococi etc.

Printre enzimele bacteriene care atacă dizaharidele vom cita *invertaza*, care se găseşte la unele specii de *B. megatherium*, *B. mesentericus*, *Proteus vulgaris*, genurile *Pseudomonas*, *Vibrio*, şi care are proprietatea de a inverti zaharul dextrogir în levogir. *Maltaza* desface maltoza în două molecule de glucoză. A fost descrisă la *C. diptheriae*, *Dipl. pneumoniae*, *Cl. botulinum*, *Esch. coli* etc. *Lactaza* este prezentă la o serie de germeni patogeni, ca *Esch. coli*, unele salmonele, unii bacili dizenterici etc.

3. *Glucozidazele*, o altă clasă de enzime bacteriene, hidrolizează glucozidele ca arbutina, salicina, amigdalina, esculina. În unele cazuri activitatea lor serveşte la identificarea anumitor specii microbiene.

4. *Glucoproteinazele* sînt enzime care hidrolizează mucinele, eliberînd carbohidraţi şi proteine. În această grupă intră *mucinaza*, enzimă care a fost izolată şi studiată la *Cl. perfringens*. Tot din această grupă face parte *hialuronidaza*, enzimă care atacă acidul hialuronic, polimer de acid glucuronic şi N-acetil glucozamină. Această substanţă intră în compoziţia ţesutului conjunctiv, unde creează, prin compoziţia sa, o stare de impermeabilitate a acestui ţesut faţă de agenţii nocivi. O serie de bacterii patogene, ca : stafilococii, streptococii, pneumococii, germenii gangrenei gazoase, secretă hialuronidază care, depolimerizînd acidul hialuronic, permeabilizează bariera naturală formată de ţesutul conjunctiv, uşurînd pătrunderea şi răspîndirea germenilor în organisme. Din această cauză hialuronidaza a mai fost numită şi „factor de invazie”.

5. *Enzimele proteolitice.* Capacitatea proteolitică a bacteriilor este cunoscută de multă vreme. De altfel, microorganismele au fost clasate în mod general în „germeni de putrefacţie” şi „germeni de fermentaţie”, după cum atacă mai cu predilecţie respectiv proteinele sau carbohidraţii.

Enzimele proteolitice acţionează, fie numai asupra proteinelor naturale (proteinaze), fie numai asupra produselor lor de degradare (peptidaze). Ele au fost cercetate la multe bacterii saprofite şi patogene. Puterea proteolitică a unor germeni saprofiţi este chiar utilizată în unele industrii textile.

Cît priveşte activitatea proteolitică a germenilor patogeni, ea a făcut obiectul a multor cercetări, deoarece aceste enzime fac parte din potenţialul toxigen al anumitor specii bacteriene. Astfel, printre proteinazele microbiene, cele mai cunoscute sînt *gelatinazele* şi *colagenazele* care atacă respectiv gelatina şi colagenul. Acţiunea colagenazei la *Cl. welchii* a fost studiată pe muşchii izolaţi, constatîndu-se că sub acţiunea ei acest organ se transformă într-o masă fibrilară, din care ţesutul suport şi sarcolema au dispărut. Gelatinaza a fost pusă în evidenţă la diferite specii microbiene. La genul *Clostridium*, gelatinaza este prezentă numai la speciile cu putere invadantă (*Cl. welchii*, *Cl. histolyticum*, *Cl. septicum*), iar speciile care nu au această caracteristică (*Cl. botulinum*, *Cl. tetani*) sînt lipsite de acest ferment. Ionul de Ca^{++} măreşte activitatea gelatinazică la *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *Proteus vulgaris*, *Ps. fluorescens* şi *Ps. aeruginosa*.

O altă protează bacteriană este *streptokinaza*, produsă de streptococii din grupa A şi C, enzimă care hidrolizează, printr-un proces complex, fibrina din sîngele coagulat.

Peptidazele sînt enzime care atacă produşii intermediari de degradare a proteinelor (nu însă aminoacizii). După natura legăturilor asupra cărora acţionează, au fost clasate în diverse subgrupe, ca : aminopeptidaze, carboxilpeptidaze, dipeptidaze, studiate la multe bacterii patogene şi saprofite.

6. *Amidazele* sînt enzime care desfac legăturile între carbon şi azot. Dintre acestea, cele mai studiate la bacterii sînt : *arginaza* de la streptococi, *ureaza* de la *Esch. coli*, *Proteus*, corinebacterii, stafilococ, *hipuricaza*, *guanaza* etc.

7. *Nucleazele.* În sens larg, sub această denumire se înţeleg toate enzimele care participă la metabolismul acizilor nucleici. Ele au

fost puse în evidență la toate bacteriile cercetate, și în primul rînd *ribonucleaza*, care depolimerizează acidul ribonucleic, și *dezoxiribonucleaza*, care depolimerizează acidul dezoxiribonucleic. La streptococi în filtratele culturilor au fost studiate în special aceste ultime enzime, ele participînd, alături de alte enzime, la potențialul toxigen al germenului. La bacterii s-au studiat și enzimele care atacă produșii de degradare a acizilor ribo- și dezoxiribonucleic (nucleotidaze, nucleozidaze etc.).

Transferazele. Sînt o clasă de enzime care au rolul de a transfera anumiți radicali de pe o moleculă pe alta, deținînd un rol important în metabolism. În anumite cazuri ele pot îndeplini rolul de agenți detoxifianți, prin blocajul chimic al unor substanțe toxice (transmetilaze, transsulfuraze).

O serie de tipuri de transferaze, ca aminoferazele (Braunstein și Kritzman), pot cataliza transferul grupărilor aminice de la aminoacizi la cetoacizi, proces prin care ia naștere un nou aminoacid. S-au descris astfel de enzime la : *Esch. coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Cl. perfringens*, streptococi, pneumococi, bacilul tuberculozei etc.

Desmolazele. În această categorie de enzime intră totalitatea acelora care participă la oxidoreducerile biologice, luînd parte la respirația celulară. Ele se împart în : *oxidaze*, care catalizează fixarea oxigenului molecular pe hidrogenul din substrat. Exemple sînt: citocromoxidaza sau fermentul respirator Warburg, care catalizează oxidarea citocromilor, precum și *oxidaza acidului ascorbic*, *polifenoloxidazele*, *tirozinaza*, care au fost studiate la multe bacterii. Tot din această grupă face parte *luciferaza*, enzimă care catalizează mecanismul biochimic al luminiscenței întîlnit la unele bacterii marine.

Dehidrogenazele sînt altă clasă de desmolaze, care catalizează transferul hidrogenului de pe o moleculă pe alta. Rezultatul activității lor este o concomitentă reducere a substanței care acceptă hidrogenul și o oxidare a substratului care îl pierde. Dehidrogenazele *aerobe* sînt cele care catalizează reacțiile între substrat și oxigen (rezultînd apă oxigenată, prin transferul H pe O), iar cele *anaerobe* transferă hidrogenul pe o substanță diferită de oxigen. Printre dehidrogenaze aerobe sînt *xantin-oxidaza*, flavoproteină care catalizează dehidrogenarea xantinei cu producere de acid uric. La germenul *Clostridium acidiurici* acest proces a fost studiat în mod amănunțit. Cît despre dehidrogenazele anaerobe bacteriene, ele au fost puse în evidență la cele mai variate specii microbiene și pentru un număr foarte mare de substanțe donatoare de H, ca zaharuri, aminoacizi, acizi organici, alcooli etc.

Peroxidazele sînt enzime care catalizează oxidarea substanțelor prin intermediul apei oxigenate. Ele sînt de natură proteică, cu grupare prostetică hemina, și se găsesc la bacteriile aerobe.

Catalaza este o enzimă cu constituție asemănătoare peroxidazelor și, împreună cu acestea din urmă, asigură eliminarea peroxidului de hidrogen, format de sistemele enzimatice celulare. Catalaza bacteriană a fost cristalizată și s-a descris aproape la toate speciile aerobe. La genul *Brucella*, activitatea catalazică este cu atît mai scăzută, cu cît specia microbiană are o virulență mai redusă. Bacilii tuberculozei hidrazidorezistenți atenuați sînt caracterizați prin faptul că și-au pierdut activitatea catalazică.

În acest capitol s-a căutat a se releva mai ales acele clase de enzime care au fost studiate în mod deosebit la bacterii, fie prin faptul că imprimau genului sau speciei respective o caracteristică specială, care servea la identificare, fie prin faptul că activitatea lor prezintă, pentru organismele parazitate, un caracter toxic. O serie de alte enzime care intervin în diferite metabolisme au putut fi identificate la microorganisme, chiar înainte de a fi evidenţiate în celulele animale sau vegetale. De asemenea, trebuie să relevăm că în procesul de sporogeneză s-a reuşit să se identifice enzime caracteristice, care dispar la forma vegetativă.

Nutriţia bacteriilor

Prin nutriţia bacteriană trebuie să înţelegem suma tuturor proceselor metabolice prin care aceste fiinţe îşi procură materialul plastic şi energetic din mediul înconjurător şi pe care îl transformă conform necesităţilor speciei considerate.

În munca de rutină microbiologii folosesc în acest scop medii de cultură complexe, în care se includ diverse extracte de carne, de vegetale, lichide biologice şi săruri minerale, care corespund întru totul scopului practic al acestei discipline.

Progresele realizate în domeniul fiziologiei microbiene au permis însă elaborarea de medii sintetice în care se încorporează strict substanţele necesare nutriţiei germenilor respectivi. Aceste substanţe, a căror constituţie chimică este cunoscută şi care prin marcare cu izotopi radioactivi fac posibilă urmărirea pe parcursul întregului lor lanţ metabolic în celulă, au uşurat considerabil lămurirea unor procese fizico-chimice care se petrec în sînul microorganismelor.

Tipurile de nutriţie bacteriană

În acest capitol se va rezuma ansamblul cunoştinţelor noastre privind tipurile de nutriţie bacteriană şi felul în care specialiştii le-au clasat pe baza modului de utilizare a surselor de carbon, azot şi energetice. În afară de aceste necesităţi de bază ale nutriţiei bacteriene, o serie de alte condiţii sînt însă necesare pentru dezvoltarea acestor fiinţe. Astfel, cantitatea de apă, de săruri, tensiunea de oxigen şi bioxid de carbon, concentraţia de ioni de H^+, temperatura, precum şi substanţe speciale de tipul factorilor de creştere sînt de o importanţă covîrşitoare pentru nutriţia bacteriană.

După modul lor natural de existenţă, microorganismele au fost împărţite în mai multe categorii, şi anume:

Microorganisme saprofite sînt cele care folosesc ca materii nutritive substanţele organice provenite din corpul altor fiinţe moarte sau pe socoteala excretelor lor.

Microorganisme parazite, care se dezvoltă pe seama altor organisme vii, cu sau fără consecinţe grave pentru gazdă.

Microorganisme autotrofe, care în lipsa materiei organice nutritive îşi formează constituenţii organici prin reducerea bioxidului de carbon (sau a bicarbonaţilor) şi din amoniac, dacă au la dispoziţie o sursă de energie.

Modul de existență natural determină, după cum este și normal, necesitățile nutritive și mediul de cultură folosit. Astfel, microorganismele proteolitice vor avea nevoie de surse nutritive bogate în proteine, pe cînd cele care fermentează carbohidrații vor necesita zaharurile respective în mediu.

Din punct de vedere al modului de nutriție, fiziologia microbiană împarte microorganismele în autotrofe și heterotrofe. Primele, la rîndul lor, au fost subîmpărțite în două clase, după sursa de energie pe care sînt capabile să o utilizeze în desfășurarea proceselor metabolice. O grupă de autotrofe sînt denumite *chemosintetice*, deoarece energia necesară le este furnizată prin oxidarea diferitelor substraturi, caracteristice speciei considerate. În această grupă intră, de pildă, microorganisme saprofite din pămînt și ape care joacă rol important în circulația azotului. Astfel, *Nitrosomonas* oxidează amoniacul în nitriți și *Nitrobacter* oxidează nitriții în nitrați.

A doua grupă este reprezentată prin autotrofele *fotosintetice*, microorganisme anaerobe, care își obțin energia necesară metabolismului prin utilizarea fotochimică a energiei luminoase.

Pentru captarea energiei luminoase, bacteriile din această categorie posedă pigmenți care îndeplinesc același rol pe care îl joacă clorofila la plante.

Bacteriile cu tip de nutriție *heterotrof* sînt caracterizate prin faptul că sursa de carbon pe care o folosesc este de natură organică, pe cînd azotul poate fi, atît organic, cît și anorganic. Sursa de energie a acestor microorganisme este furnizată de procesele de degradare oxidativă și fermentativă a substanțelor organice.

Bacteriile heterotrofe, spre deosebire de cele autotrofe, au o diversitate foarte mare de tipuri de nutriție. Totuși ele au putut fi clasate în mai multe subgrupe. Astfel sînt:

1. ***Microorganismele care fixează azotul atmosferic***; sînt germeni saprofiți ca, de exemplu: *Azotobacter* care utilizează ca sursă de C — carbohidrații fermentescibili.

2. ***Microorganisme care sînt „nedependente" de substanțe speciale***; această grupă de heterotrofe utilizează azotul din amoniac sau din nitrați, carbonul din substanțe organice simple ca, de pildă, glucoza, iar energia o obțin din degradarea materiei organice. Cele mai multe heterotrofe intră în această categorie, de exemplu bacilul coli.

3. ***Microorganisme dependente de anumiți aminoacizi***; sînt atît germeni saprofiți, cît și paraziți, care, neputînd să-și sintetizeze anumiți aminoacizi, trebuie să găsească aceste substanțe fundamentale din constituția proteinelor preformate în mediul de cultură.

În anumite condiții, bacteriile dependente pot fi obișnuite să-și fabrice singure substanțele necesare. Exemplul caracteristic este cazul *S. typhi*, care în mod obișnuit nu se dezvoltă dacă nu găsește triptofanul preformat, totuși prin antrenare pe medii din ce în ce mai sărace în triptofan s-au putut izola și tulpini care îl sintetizează din alți constituenți.

4. ***Microorganismele dependente de factori de creștere***; s-a văzut că anumite bacterii, pe lîngă substanțele nutritive

de bază şi pe lîngă un ansamblu de condiţii fizico-chimice speciale de dezvoltare (temperatură, pH, cantitate de O_2), mai au nevoie în cantităţi extrem de mici şi de anumite substanţe, care au fost denumite „factori de creştere" sau vitamine bacteriene. Aceste substanţe speciale sînt de obicei aduse în mediul de cultură de către diverşi produşi organici complecşi, ca : serul, extractul de drojdie şi carne. Bacteriile saprofite, în viaţa liberă, îşi procură aceşti factori de creştere din mediul înconjurător, iar cele parazite din organismul-gazdă. Denumirea de vitamine bacteriene este justificată de faptul că realmente unele dintre ele sînt vitamine adevărate, cunoscute ca biocatalizatori ai organismelor superioare.

Cantităţile extrem de mici necesare pentru promovarea dezvoltării demonstrează că aceste substanţe nu pot îndeplini un rol plastic sau energetic în celulă, ci numai funcţia de biocatalizatori, fie direct, fie intrînd în compoziţia unei substanţe mai complexe, de pildă o enzimă.

Factorii de creştere au putut fi clasificaţi în :

1. *Factori de creştere esenţiali*, pe care germenii nu-i pot sintetiza, fiind absolut necesar să fie incluşi în mediul de nutriţie.

2. *Factori de creştere stimulanţi* sînt cei a căror lipsă nu împiedică complet dezvoltarea, dar a căror prezenţă o favorizează.

3. *Factori de creştere sintetizaţi de celula bacteriană* şi care, în consecinţă, pot lipsi din mediul înconjurător.

Vom cita o serie de factori de creştere studiaţi la bacterii.

— *Vitamina B_1* (aneurina sau tiamina) este esenţială pentru dezvoltarea stafilococilor, streptococilor, brucelelor şi unor salmonele, participînd la metabolismul glucidic.

— *Vitamina B_2* (riboflavina) este o coenzimă necesară dezvoltării streptococilor şi bacteriilor lactice.

— *Vitamina PP* (nicotinamida), factor de creştere esenţial al bacililor paratifici, dizenterici etc.

— *Coenzima I* (nucleotidul de fosfopiridină) sau factorul V, precum şi *hematina* (sau factorul X) sînt esenţiale pentru dezvoltarea germenilor hemofili, care de altfel au fost clasaţi, pe baza acestor exigenţe, în modul următor : *Haemophilus influenzae* necesită, atît factorul V, cît şi X ; *Haemophilus parainfluenzae* necesită numai factorul V, iar *Haemophilus canis* numai factorul X.

— *Vitamina B_6* (piridoxina), *vitamina H* (biotina) sînt vitamine esenţiale pentru cocii patogeni, bacilii dizenterici, difterici, bacteriile anaerobe etc.

Acidul pantotenic, acidul folic, acidul paraaminobenzoic, vitamina B_{12}, vitamina C, vitamina K au fost studiate şi s-a identificat rolul lor în fiziologia multor specii bacteriene parazite şi saprofite.

Alături de aceste vitamine adevărate, rolul de factori de creştere la bacterii îl joacă şi o serie de alte substanţe. Astfel sînt unele baze purinice şi pirimidinice, unii aminoacizi, acidul oxalic şi piruvic etc.

Bacteriile, pe de altă parte, constituie o importantă sursă de vitamine, mai ales din grupul B. Este ştiut de altfel că bacteriile intestinale secretă vitamine, iar sterilizarea organismului în urma tratamentului masiv cu antibiotice duce la carenţă vitaminică.

Necesităţile bacteriilor în CO_2

S-a crezut multă vreme că tipul de nutriţie autotrof se deosebeşte fundamental de tipul de nutriţie heterotrof, pe baza capacităţii de asimilare a CO_2. Într-adevăr, se atribuia capacitatea de a utiliza acest gaz ca singură sursă de carbon numai autotrofelor.

Cercetările lui Wood şi Werkman, realizate cu ajutorul izotopilor radioactivi, au arătat însă că şi bacteriile cu tip de nutriţie heterotrof sînt capabile de a utiliza CO_2. Astfel s-a demonstrat că CO_2 marcat se regăseşte în acidul oxalacetic, acidul piruvic, acidul formic, acidul acetic etc. la aceste bacterii.

Este ştiut, de asemenea, că la elaborarea anumitor toxine (α-toxina stafilococică) este necesară prezenţa unei tensiuni mărite de CO_2 în mediul de cultură.

Necesităţile bacteriilor în oxigen

După necesităţile în oxigen molecular, microorganismele au fost împărţite în mai multe categorii.

Astfel, speciile pentru care O_2 reprezintă o materie nutritivă esenţială se numesc *aerobe stricte*. Acestea sînt caracterizate prin faptul că izvorul de energie este furnizat de procesele respiratorii. Există însă şi specii bacteriene pentru care oxigenul reprezintă un factor inhibitor al dezvoltării. Acestea au fost numite bacterii *anaerobe stricte*. În acest caz se crede că prezenţa oxigenului ar „otrăvi" anumite sisteme enzimatice celulare, care prin oxidare s-ar inactiva. Aceste bacterii necesită medii în care oxigenul a fost eliminat (prin vid sau fierbere) sau în care s-au încorporat substanţe puternic reductoare.

Există, de asemenea, specii bacteriene care au capacitatea de a creşte, atît în prezenţa, cît şi în absenţa oxigenului, ele fiind denumite *anaerobe facultative*. Trecerea acestor microorganisme de la aerobioză la anaerobioză necesită însă adăugarea în mediul de cultură a unor substanţe nutritive speciale. Astfel, pentru cultivarea stafilococului auriu în anaerobioză este necesară prezenţa uracilului în mediu.

În sfîrşit, există o categorie de germeni care se dezvoltă mai bine la tensiuni mai scăzute de oxigen decît tensiunea normală; aceştia au fost incluşi în grupa microaerofililor.

Rolul concentraţiilor ionilor de hidrogen (pH)

Reacţia mediului are o importanţă covîrşitoare în manifestarea proceselor vitale; microorganismele prezintă însă o mare diversitate în privinţa limitelor de toleranţă a acestui factor. Astfel se cunosc bacterii care suportă acidităţi şi alcalinităţi incompatibile cu viaţa fiinţelor superioare. De exemplu, *Thiobacillus thiooxidans* poate supravieţui cîtva timp, atît la pH 1, cît şi la pH 13.

În tabelul II s-au înfăţişat o serie de germeni saprofiţi şi patogeni cu pH optim pentru dezvoltare, ca şi limitele de variaţie tolerabile.

Tabelul II

Limitele de pH pentru dezvoltarea unor specii bacteriene

Microorganism	Minim	Maxim	Optim
Dipl. pneumoniae	7,0	8,3	7,8
Str. pyogenes	4,5	9,2	7,8
Str. viridans	4,5	8	6,8–7,8
N. meningitidis	6,1	7,8	7,4
N. gonorrhoeae	5,8	8,3	7,3
Escherichia coli	4,3	9,5	6,0–7,0
Salmonella typhi	4,0	9,6	6,8–7,2
Shigella dysenteriae	4,5	9,6	cca. 7
Brucella melitensis	6,5	8,4	6,6–8,2
Proteus vulgaris	4,4	9,2	7,5
Ps. pyocyanea	4,4	8	6,6–7,0
Cl. tetani	5,5	8,3	7,0–7,6
Nitrobacter	5,7	10,2	8,4–9,2
Thiob. thiooxidans	1,0	9,8	2,0–4,0
Thiob. denitrificans	5,0	10,7	7,0–9,0
C. diphteriae	6,0	8,3	7,3–7,5
Mycob. tuberculosis	5,0	8,4	6,8–7,7

Modul de existenţă natural a speciei respective se reflectă în zona de pH tolerabilă în dezvoltarea *in vitro*. Din ansamblul datelor culese din literatură se poate trage concluzia că speciile patogene pentru om şi animale au o zonă de pH îngustă, în limitele căreia se pot dezvolta; pentru majoritatea, acest optim este situat în jurul neutralităţii. Sînt unele bacterii care trăiesc în sol şi care tolerează valori de pH alcaline destul de ridicate.

În viaţa lor liberă microorganismele sînt supuse la mari variaţii de pH, datorită interacţiunii cu flora înconjurătoare. Această „concurenţă" conduce la o selecţie permanentă a speciilor în natură. Astfel, în condiţii care favorizează dezvoltarea cu precădere a mucegaiurilor, acestea avînd pH optim de dezvoltare în zona acidă, se vor elimina în mod natural speciile bacteriene sensibile la aciditate mărită. Acelaşi fenomen se observă şi în dezvoltarea unei flore microbiene cu valori de pH optime alcaline (nitrobacteriile).

Rolul temperaturii în dezvoltarea bacteriană

Temperatura este unul din factorii importanţi în dezvoltarea microorganismelor. Acţiunea acestui factor fizic se manifestă în diferite moduri asupra bacteriilor, după gradul şi timpul de acţiune, putînd stimula creşterea sau putînd provoca alterări de diferite intensităţi, care pot uneori favoriza pierderea anumitor caractere ale speciei respective (de exemplu patogenitate), sau provoca moartea celulară.

Bacteriile, întocmai ca orice celulă vie, prezintă o zonă cu temperaturi minime, optime şi maxime de dezvoltare, denumite „temperaturi cardinale" şi care sînt caracteristice fiecărei specii.

Temperatura minimă de dezvoltare. Bacteriile prezintă o mare diversitate în ce priveşte temperatura minimă de dezvoltare.

Dacă la bacteriile patogene pentru om şi animale această temperatură este foarte apropiată de temperatura optimă, în natură există condiţii care obligă anumite alte specii să trăiască chiar la temperaturi sub 0°. Astfel sînt bacteriile din abisurile marine şi cele din oceanele îngheţate.

Caracteristica fiziologică a bacteriilor care se dezvoltă la temperatura minimă este lungimea timpului de generaţie, comparativ cu cel al temperaturii optime. Acest fapt se atribuie modificării proprietăţilor fizice ale constituenţilor protoplasmatici, precum şi schimburilor prin difuziune, care se fac mult mai încet.

Dacă germenii sînt ţinuţi la temperaturi foarte joase survine moartea celulară, datorită faptului că solvenţii îngheţînd, sărurile se concentrează, provocînd moartea printr-un fenomen de „salifiere" excesiv.

Temperatura optimă de dezvoltare. Microorganismele au fost împărţite în 3 grupe, pe baza temperaturii optime de dezvoltare.

1. *Microorganismele mezofile* sînt acelea ale căror temperaturi optime sînt cuprinse între 20 şi 37°. În această categorie intră majoritatea bacteriilor saprofite şi parazite.

2. *Microorganismele termofile* cuprind specii saprofite al căror optim de dezvoltare se situează peste 40°, unele chiar atingînd optime între 65 şi 70°. Aceşti germeni, care trăiesc la temperaturi incompatibile cu viaţa celorlalte fiinţe, prezintă o fiziologie cu totul specială, a cărei caracteristică dominantă este un metabolism excesiv de ridicat şi un timp de generaţie extrem de scurt. Problema termobiozei nu a fost încă pe deplin lămurită pe plan biochimic, deoarece atît proteinele, cît şi enzimele care au putut fi izolate de la aceste microorganisme nu au prezentat caractere de rezistenţă termică specială *in vitro* şi nici constituţie chimică deosebită de cea a microorganismelor mezofile.

3. *Microorganismele psihrofile* sînt bacterii de tipul *Pseudomonas, Achromobacter, Flavobacterium, Alcaligenes, Micrococcus*, al căror optim de temperatură de dezvoltare este cuprins între 20 şi 40°, dar care se pot dezvolta în decurs de 2 săptămîni şi la 0°, avînd minimul la —10° (Ingrahm şi Stokes, 1959). Ele au o largă răspîndire în natură şi sînt caracterizate prin faptul că la 0° au o activitate biochimică intensă. Astfel, unele prezintă luminiscenţă, secretă pigmenţi, fermentează carbohidraţii, descompun proteine etc., dar mecanismul biochimic care permite realizarea acestor procese la 0° nu este cunoscut.

Microorganismele psihrofile nu sînt patogene pentru om şi animale, însă prezintă interes pentru microbiologia alimentară, prin faptul că pot altera alimentele conservate prin îngheţare.

Temperatura maximă de dezvoltare reprezintă cea mai înaltă temperatură la care procesele biologice sînt posibile. Aceasta variază cu specia considerată, cu constituţia mediului ambiant şi cu vîrsta celulară. Importanţa practică a cunoaşterii acestui punct cardinal al temperaturii este în legătură cu problemele de sterilizare, care sînt abordate în capitolul de tehnică.

Metabolismul energetic bacterian

Respirația și fermentația

Respirația este definită, în general, ca totalitatea proceselor biochimice, aerobe sau anaerobe, prin care celula eliberează energia necesară activității sale vitale.

Energia poate fi eliberată prin procese de oxidare aerobă, în care intervine oxigenul fixîndu-se pe substrat. Din punct de vedere chimic însă, procesul de pierdere a hidrogenului, în absența oxigenului, este de asemenea un fenomen de oxidare, dar anaerobă. De exemplu, transformarea clorurii cuproase în clorură cuprică:

$$CuCl \rightarrow CuCl_2$$

$$Cu^{+} \rightarrow Cu^{++}$$

În acest proces se pierd una sau mai multe sarcini electrice negative, adică se pierd unul sau mai mulți electroni, care sînt acceptați de altă substanță. Această substanță acceptoare, mărindu-și sarcina electrică negativă, suferă un proces de reducere.

Sistemele biologice — în funcție de condițiile mediului — sînt capabile să piardă electroni (oxidare) sau să accepte electroni (reducere), iar ansamblul acestor procese constituie așa-numitul potențial de oxidoreducere celular.

Această concepție a oxidării prin dehidrogenare a fost pentru prima dată propusă de Palladin (1908—1913). Ulterior, Wieland, Thunberg, Michaelis, Keilin și alții au dezvoltat această teorie, arătînd existența unor enzime specifice care îndeplinesc rolul de a transporta hidrogenul de la substanța donatoare (care va rămîne oxidată), la substanța acceptoare (care va deveni redusă). Aceste enzime au fost denumite „deshidraze" și în celulele microbiene s-au pus în evidență un număr considerabil, ceea ce face pe unii autori să spună că „respirația deshidrazică reprezintă funcția vitală cea mai importantă a bacteriilor".

După natura acceptorului de hidrogen, oxidoreducerile la microorganisme au fost clasificate în următoarele categorii:

1. Oxidoreduceri intramoleculare, în care aceeași moleculă joacă, atît rolul de donator de hidrogen, cît și de acceptor de hidrogen, de exemplu: conversia glucozei în două molecule de acid lactic.

2. Oxidoreduceri intramoleculare, în care donatorul și acceptorul de hidrogen sînt metaboliți celulari. Acest tip de proces este caracteristic fermentațiilor (anaerobiozei).

3. Oxidoreduceri intermoleculare, în care acceptorul de hidrogen este oxigenul și care sînt caracteristice proceselor aerobe, respectiv bacteriilor aerobe. Această ultimă categorie de oxidoreduceri este caracterizată prin eliberarea unei mari cantități de energie și a fost îndeosebi studiată la bacterii, ceea ce a ușurat elucidarea multor etape ale metabolismului energetic la aceste ființe.

Transportul hidrogenului de la un anumit substrat la oxigen implică însă participarea unor serii întregi de enzime și coenzime, care îl pot transfera direct pe substratul acceptor sau îl pot ceda altor enzime, care își vor asuma acest rol. Astfel dehidrogenazele piridinnucleotidice transferă hidrogenul enzimelor flavinice. Acestea, dacă îl fixează direct pe oxigenul molecular se numesc „diaforaze”, dar mai pot transfera electronul, provenit din disocierea hidrogenului, pe sistemul citocromic. Citocromii a, b, c transferă, la rîndul lor, electronul acceptat „citocromoxidazei”, enzimă care îl va fixa final pe oxigen. În acest mod, sistemul citocromic face legătura între sistemul enzimatic deshidrazic și sistemul enzimatic oxidazic. În cursul acestor procese de transfer al hidrogenului ia naștere peroxidul de hidrogen, substanță toxică pentru celulă, dar care grație „catalazelor” și „peroxidazelor” va fi descompus în apă oxigenată, în oxigen molecular ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$).

Importanța transferului de hidrogen de la un donator la acceptorul final prin intermediul unei serii întregi de catalizatori, care la rîndul lor sînt oxidați și reduși reversibil, are ca rezultat o degajare treptată de energie, fapt care dă posibilitate celulei de a o utiliza gradat și deci cît mai eficace pentru realizarea proceselor metabolice.

Trebuie însă specificat că nu toate bacteriile conțin sistemul citocromic, după cum anumite specii posedă numai o parte dintre ei. Astfel, bacteriile aerobe stricte (*B. subtilis, B. anthracis, B. piocianic, C. diphtheriae* etc.) dețin toți trei citocromii, a, b și c. La acești germeni activitatea citocromoxidazică este deosebit de intensă, această enzimă avînd rolul de a transfera hidrogenul de la citocromi pe oxigen. O serie de alte microorganisme, ca, de exemplu, *Esch. coli, Shigella, S. typhi*, streptococul etc. posedă numai unul sau doi din citocromi, fapt care se reflectă și într-un conținut mai scăzut în citocromoxidază. În sfîrșit, anaerobii stricți neavînd nici o componentă a sistemului citocromic, nu au activitate citocromoxidazică.

Microorganismele heterotrofe obțin energia necesară metabolismului celular, atît din oxidările anaerobe (fermentații), cît și din cele aerobe (respirație) efectuate pe seama diferitelor substraturi din mediu.

Există însă și o altă sursă importantă de energie celulară ; sînt legăturile „*macroergice*” (Engelhardt și Liubimova) ale fosforului, cum este de exemplu acidul adenozintrifosforic (ATF). În cursul procesului de respirație, energia rezultată din oxidoreducerile celulare nu este pierdută sub formă de căldură, ci este acumulată de radicalul fosforic în legătura carboxilfosforică (ATF) sau în cea nitrogenfosforică (fosfocreatină).

Pentru a avea o idee de importanța acestor acumulări de energie în legăturile cu potențial energetic înalt, s-a calculat că prin hidroliza ATF se pun în libertate 12 000—16 000 calorii.

În procesele de respirație aerobă, intervenția directă a oxigenului eliberează din substrat o cantitate însemnată de energie. Astfel, prin oxidarea completă a glucozei, proces realizat de multe microorganisme aerobe, se obține final : $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O + 686\,000$ calorii.

Germenii anaerobi își procură energia necesară activității lor metabolice prin procese fermentative, în absența oxigenului și mai ales pe seama glucidelor. În acest caz eliberarea de energie este mult mai mică, iar descompunerea glucozei se oprește la stadiul de acid piruvic ⇄ acid lactic.

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_3H_6O_3 + 54\,000 \text{ calorii}$$

În tot cursul procesului de fermentație intervin compuși macroergici ai fosforului, ca : acidul adenozindifosforic (ADF), acidul adenozintrifosforic (ATF), acidul difosfogliceric, difosfopiridinnucleotidul sau coenzima I (DFN), acidul fosfoenolpiruvic, care furnizează energia necesară înfăptuirii acestui proces, după schema de mai jos.

Descompunerea anaerobă a glucozei (fermentaţie)
(după Meyerhof-Embden)

1. Glucoza + ATF → glucozo-6-fosfat + ADF
Glucozo-6-fosfat $\rightleftharpoons$ fructozo-6-fosfat
fosfohexozisomerază
3. Fructozo-6-fosfat + ATF → fructozo-1,6-difosfat + ADF
4. Fructozo-1,6-difosfat $\rightleftarrows$ 3-fosfogliceraldehidă + dihidroxiacetonă
aldolază
izomerază
5. 3-fosfogliceraldehidă + H_3PO_4 $\rightleftharpoons$ 1,3-difosfogliceraldehidă
6. 1,3-difosfogliceraldehidă + DFN $\rightleftarrows$ 1,3-acid difosfogliceric + $DPNH_2$
7. 1,3-acidul difosfogliceric + ADF $\rightleftharpoons$ 3-acid fosfogliceric + ATF
8. acid fosfogliceric $\rightleftharpoons$ 2-acid fosfogliceric
9. 2-acid fosfogliceric $\rightleftarrows$ acid fosfoenolpiruvic + H_2O
10. Acid fosfoenolpiruvic + ADF $\rightleftharpoons$ acid piruvic + ATF
11. Acid piruvic + $DFNH_2$ $\rightleftharpoons$ acid lactic + DFN
dehidrogenoza lactică

Caracteristic este faptul că această schemă de fermentaţie a glucozei este comună tuturor celulelor vii, nu numai microorganismelor. Acestea din urmă diferă, însă, între ele, prin posibilitatea de a-şi sintetiza, sau nu, catalizorii necesari (ATF, coenzima I etc.). O dată ce s-a ajuns la stadiul de acid piruvic, căile metabolice ale diferiţilor germeni se separă şi direcţia în care vor evolua este caracteristică fiecărei specii şi uneori chiar fiecărei tulpini microbiene. De asemenea, calea de degradare a acidului piruvic este influenţată de condiţiile mediului, ca: pH, absenţa sau prezenţa,

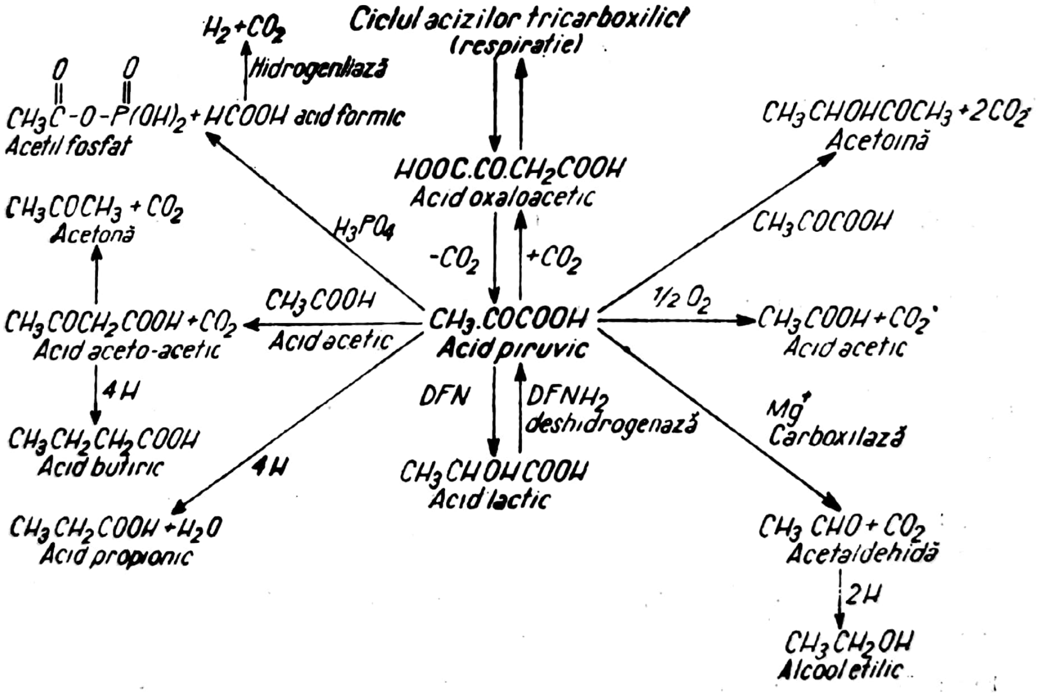

H2+CO2
Ciclul acizilor tricarboxilici
(respiraţie)
Hidrogenliază
O O
CH3C-O-P(OH)2+HCOOH acid formic
Acetil fosfat
CH3CHOHCOCH3+2CO2
Acetoină
HOOC.CO.CH2COOH
Acid oxaloacetic
CH3COCH3+CO2
Acetonă
H3PO4
CH3COCOOH
-CO2
+CO2
CH3COOH
CH3.COCOOH
Acid piruvic
1/2 O2
CH3COCH2COOH+CO2
Acid aceto-acetic
Acid acetic
CH3COOH+CO2
Acid acetic
4H
DFN
DFNH2
deshidrogenază
Mg+
Carboxilază
CH3CH2CH2COOH
Acid butiric
4H
CH3CHOHCOOH
Acid lactic
CH3CH2COOH+H2O
Acid propionic
CH3CHO+CO2
Acetaldehidă
2H
CH3CH2OH
Alcool etilic

Fig. 37. — Poziţia centrală a acidului piruvic în reacţiile fermentative (Dubos).

precum şi concentraţia anumitor factori inhibitori sau stimulanţi, temperatura, prezenţa oxigenului etc.

Astfel, s-a constatat că streptococii hemolitici produc din acid piruvic, prin reducere, acid lactic, iar *Esch. coli* şi *Streptococcus faecalis*, în anaerobioză, acumulează acid acetic şi lactic. De asemenea, deficienţa în fier a mediului provoacă la *Cl. welchii* apariţia de acid lactic ca rezultat al fermentării glucozei, însă la concentraţii normale, în acest element apar acidul butiric, acidul acetic şi cantităţi însemnate de hidrogen şi bioxid de carbon.

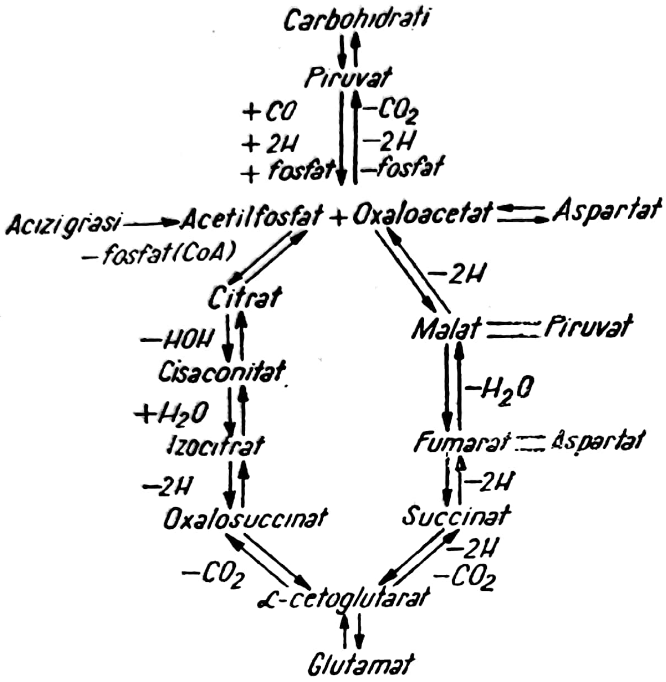


Fig. 38. — Ciclul acizilor tricarboxilici.

Metabolizarea anaerobă a glucozei pînă la stadiul de acid piruvic este identică în procesele de fermentaţie şi în cele de respiraţie. Se ştie, de asemenea, încă de la Pasteur, că în condiţii de aerobioză procesele de fermentaţie sînt suprimate (efectul Pasteur).

Acidul piruvic prin fixare de CO_2 trece în acid oxaloacetic, proces comun, atît bacteriilor autotrofe, cît şi celor heterotrofe, după cum s-a arătat mai înainte. Prin această cale se deschide drumul spre faza aerobă a metabolismului carbohidraţilor — spre respiraţia propriu-zisă — în care este implicat *ciclul acizilor tricarboxilici* (fig. 38).

O altă posibilitate de pătrundere în ciclul acizilor tricarboxilici este datorită proceselor de transaminare, făcîndu-se în acest mod şi legătura cu metabolismul proteic (aspartat, glutamat).

Reacţiile care au loc în ciclul acizilor tricarboxilici sînt reacţii reversibile, catalizate de enzime specifice. Astfel, cele care urmează în schemă calea contrară acelor unui ceasornic se soldează cu o eliberare de energie de 266 000 calorii, pe cînd cele inverse conduc la sinteza de glucide de înmagazinare de energie.

Cele mai multe din etapele acestui ciclu, împreună cu enzimele respective, au fost identificate la diverse genuri de microorganisme.

★

De multe ori extraordinarul potenţial enzimatic al celulelor bacteriene a servit la lămurirea modului în care se realizează anumite procese în celulele fiinţelor superioare. Astfel, recentele lucrări ale lui Ochoa şi Kornberg au demonstrat, *in vitro*, modul în care se sintetizează acizii nucleici, folosind o enzimă de natură bacteriană. O serie de vitamine, de diverşi compuşi intermediari caracteristici diferitelor metabolisme celulare au fost izolaţi pentru prima dată la microorganisme. Din aceste considerente, şi mai ales dat fiind rolul pe care microorganismele îl joacă în natură, studiul fiziologiei microbiene devine o disciplină comună microbiologiei, biologiei şi biochimiei.

Creşterea, multiplicarea şi moartea bacteriilor

Prof. N. Nestorescu

Ca orice fiinţă vie, microorganismele cresc, se înmulţesc şi, după o perioadă de vreme, mor. Din cauza insuficienţei metodelor actuale de lucru, procesul creşterii, multiplicării şi morţii bacteriilor, în natură, este rău cunoscut; mai toate cunoştinţele pe care le posedăm azi asupra acestei probleme sînt rezultatele studiilor experimentale, care pot fi comparabile între ele numai dacă condiţiile în care au fost efectuate sînt identice.

În procesul creşterii, multiplicării şi morţii bacteriilor trebuie cunoscute două categorii de fenomene: o categorie legată de creşterea, multiplicarea şi moartea bacteriilor ca indivizi, iar a doua legată de aceleaşi fenomene, care priveşte însă populaţia microbiană în totalitate.

În prima categorie, fenomenele împrumutînd un caracter individual, creşterea şi multiplicarea individului bacterian sînt strîns legate, mai ales de zestrea lui ereditară, pe cînd fenomenele manifestate de o populaţie microbiană oarecare sînt dependente, cu precădere, de condiţiile de mediu.

Creşterea individului bacterian, caracterizată prin adăugarea de protoplasmă rezultată din predominarea fenomenelor anabolice asupra celor catabolice, imprimă un raport strîns între suprafaţa celulei microbiene şi volumul său; pe măsură ce volumul germenului microbian creşte, suprafaţa sa devine proporţional mai mică (ipoteza Leuckart-Spencer). Cînd acest raport creşte în favoarea volumului, celula bacteriană tinde la segmentare, la diviziune, la înmulţire. Cum aparatul nuclear este activ, mai ales în momentul diviziunii celulei, volumul bacteriei creşte semnificativ, (cu precădere) în perioada cînd aparatul nuclear este în repaus. O dată diviziunea sfîrşită, raportul volum-suprafaţă al bacteriei se schimbă în favoarea suprafeţei, după care se pregăteşte din nou pentru creştere, adică pentru adăugare de protoplasmă şi înmulţire consecutivă.

Cînd unul, dar mai ales mai mulţi germeni microbieni (inocul) sînt însămînţaţi într-un mediu de cultură propice, de preferinţă lichid, se asistă, la o creştere de protoplasmă a indivizilor microbieni, şi la o creştere a numărului lor. În general, creşterea numărului germenilor într-un mediu de cultură ia denumirea mai expresivă de multiplicare. În raport cu specia microbiană, multiplicarea atinge un maximum de populaţie, care se poate menţine un timp mai mult sau mai puţin îndelungat, după care se asistă la declinul ei. Prin urmare, multiplicarea germenilor microbieni este un proces ciclic, care poate fi urmărit în dinamică.

Pentru studiul multiplicării în dinamică a germenilor microbieni se utilizează, de obicei, ciclul unei culturi bacteriene în mediu lichid.

Înainte de a descrie ciclul de multiplicare a unei culturi microbiene, este de reamintit că numeroşi autori folosesc o serie de formule matematice pentru întocmirea curbei de creştere a bacteriilor. Mai toate aceste formule sînt întocmite pe presupunerea că „timpul de generaţie" a unei specii microbiene este constant şi că desfăşurarea procesului de înmulţire este totdeauna aceeaşi. Cercetările lui Malek, pe de o parte, şi ale lui Stresinski, pe de alta, au demonstrat că aceste presupuneri nu sînt totdeauna valabile şi că noi cercetări privind utilizarea acestor formule sînt indispensabile.

Pentru uşurinţa descrierii ciclului s-a convenit ca, în mod convenţional, acest proces să fie prezentat sub forma unei succesiuni de faze concretizate prin variaţiile curbei de creştere, faze care, după diferiţi cercetători, au primit denumiri variate.

Faza de lag, după cum este denumită de către Buchanan şi Monod, sau faza de ajustare după Porter, se caracterizează la început prin diminuarea numărului germenilor care constituie inoculul şi prin creşterea dimensiunilor germenilor microbieni viabili. Durata fazei de lag este funcţie de durata, mai mare sau mai mică, a unei generaţii, de specia la care ne adresăm, de cantitatea inoculului şi faza de multiplicare a culturii folosite pentru însămînţare, de mediul de cultură utilizat, ca şi de alţi factori de mediu.

Astfel, *Esch. coli* şi bacteriile termofile au o fază de lag foarte scurtă, pe cînd germenii din grupurile *Corynebacterium* şi *Mycobacterium* au una lungă. Mediile sintetice şi prezenţa antibioticelor în doze subbacteriostatice prelungesc faza de lag.

Cît priveşte cantitatea inoculului, ea joacă un rol foarte important : lungimea perioadei de lag scade cu mărimea inoculului, ea fiind o funcţie liniară a logaritmului numărului de organisme prezente în inocul (Lamanna). În această perioadă, azotul total, fosforul organic şi acidul ribonucleic (ARN) cresc pe măsură ce ne apropiem de sfîrşitul fazei ; consumul oxigenului în cantitate mare şi eliberarea azotului amoniacal sînt de asemenea semnalate în această fază.

Faza logaritmică de creştere (Buchanan) sau faza exponenţială (Monod) este concretizată printr-o reproducere constantă, în care numărul bacteriilor creşte în progresie geometrică. În această fază se constată o relaţie constantă între proporţia de creştere a protoplasmei şi reproducere. De asemenea, în această fază, timpul unei generaţii, deşi variază în funcţie de specie, este de obicei scurt. *Esch. coli* se divide o dată la 15 minute, pe cînd *M. tuberculosis* în 2—3 ore.

Sfîrşitul perioadei de lag şi începutul fazei logaritmice de creştere sînt caracterizate printr-o serie de manifestări, cunoscute sub numele de „tinereţe fiziologică". În această perioadă, microorganismele par a fi cel mai permeabile şi mai sensibile la factorii de mediu printre care sînt de reamintit căldura şi frigul, modificările în mobilitatea electroforetică, stabilitatea la aglutinare, intensitatea bazofiliei, legată mai ales de creşterea în conţinutul nucleotidelor ca şi capacitatea de a sintetiza cu uşurinţă enzime adaptative.

Faza logaritmică de creştere este influenţată de o serie de factori, printre care trebuie semnalaţi specia microbiană, mediul de cultură folosit, temperatura, pH-ul, consumul de oxigen, creşterea produselor toxice ca o consecinţă inevitabilă a metabolismului etc. Cînd concentraţiile de alimente au scăzut sub valori limită şi cînd se acumulează produse toxice de metabolism în cantitate suficientă, atunci faza exponenţială ajunge la sfîrşitul său.

În timpul fazei exponenţiale, bacteriile prezintă cele mai caracteristice proprietăţi ale speciei. Astfel, din punct de vedere morfologic, biometria germenilor este cea mai omogenă ; pe de altă parte, cu toate că în această fază cantitatea de A.R.N. scade faţă de cea constatată la sfîrşitul perioadei de lag, afinitatea tinctorială este cea mai caracteristică. Caracterele de cultură, fie în medii lichide, fie pe medii solide, sînt mai evidente în această fază ; de asemenea, activitatea echipamentului enzimatic fiind acum foarte intensă, proprietăţile biochimice şi de metabolism se manifestă în această fază în condiţii optime. Rezistenţa germenilor la agenţii fizici (căldură, lumină, radiaţii etc.), la agenţii chimici (antiseptice), ca şi la agenţii biologici (antibiotice, bacteriocine şi bacteriofag) este deosebit de caracteristică în faza exponenţială. Majoritatea datelor cunoscute în această privinţă, corect înregistrate în diferitele cercetări, sînt obţinute mai ales pe germenii microbieni, aflaţi în această fază de creştere.

Structura antigenică a bacteriilor, în complexul şi variaţia ei, este pusă în evidenţă, mai cu uşurinţă, în faza lor logaritmică de creştere ; aceleaşi fapte de observaţie sînt făcute şi în ceea ce priveşte caracterele lor esenţiale de patogenitate şi imunogeneză. Virulenţa, toxigeneza şi capacitatea antigenică a germenilor microbieni se dovedesc, de obicei, mărite, mai ales în perioada lor exponenţială de creştere.

Faza de staţionare (Monod) sau **faza maximă de staţionare** (Buchanan). Către sfîrşitul fazei exponenţiale se asistă numai la o creştere aritmetică liniară, tradusă printr-o încetinire a creşterii şi o prelungire a timpului unei generaţii, legate, probabil, de activitatea unor factori inhibitori, printre care raportul dintre oxigen şi CO_2 poate fi unul. Durata fazei de staţionare variază, în raport cu specia şi condiţiile de cultură, de la o oră la cîteva zile.

Dacă se urmăreşte în continuare ritmul de multiplicare a unei culturi microbiene, se constată, la un moment dat, că numărul germenilor rămîne practic constant. Cultura a intrat în faza de creştere staţionară. Această fază pare să fie determinată de epuizarea substanţelor nutritive şi de acumularea de substanţe toxice în mediu, care nu îngăduie menţinerea unui pH constant şi un potenţial de oxidoreducere convenabil.

Faza de staţionare, denumită şi faza de concentraţie „M", se caracterizează printr-un echilibru între numărul de bacterii care mor şi numărul de bacterii care se înmulţesc. Cel care a studiat mai în detaliu această fază, în care populaţia bacteriană atinge maximum în cultură, a fost Bail (1929). După acest autor, concentraţia „M" a unei culturi de germeni nu poate fi depăşită. Plecînd de la această constatare, Bail ajunge la următoarele concluzii :

1. Într-un mediu lichid, o specie microbiană dată posedă o concentraţie „M" particulară, proprie acestei specii.

2. Concentraţia „M" este legată direct de mărimea inoculului ; dacă acesta din urmă este introdus într-un mediu lichid, în cantitatea concentrației „M" bacteriile nu se pot înmulți. Dacă inoculul depășește concentrația „M", bacteriile mor pînă la numărul reprezentat prin această concentrație.

3. Dacă o cultură în concentrație „M" este centrifugată și supernatantul se reînsămînțează, se asistă la apariția unei noi culturi care se va îmbogăți pînă atinge concentrația „M".

4. La concentrația „M", moartea bacteriilor este egală cu creșterea numărului lor.

Observațiile lui Bail au fost analizate și de alți autori (printre care și Hinshelwood) (1938, 1946), care susțin că apariția concentrației „M" a unei culturi în mediu lichid depinde, pe lîngă specia microbiană, mai ales de mediul de cultură, care însămînțat și cultivat își epuizează materialele nutritive și acumulează produse toxice. În sprijinul acestor observații sînt cercetările lui Monod care, lucrînd cu *Esch. coli* și *B. subtilis*, însămînțate pe medii convenabile, a constatat o relație strictă între concentrația inițială a zahărului supus fermentației și populația maximă atinsă de germenii vizibili, precum și cercetările lui Chesney, care a demonstrat că în cultură, ritmul de creștere a pneumococilor, de exemplu, scade proporțional cu acumularea unui principiu toxic.

Faza de declin (Monod) sau faza de moarte logaritmică (Buchanan). În această fază, numărul germenilor morți întrece repede numărul germenilor vii. Cauzele morții germenilor în natură sînt puțin cunoscute; mai toate datele referitoare la agenții care determină moartea bacteriilor sînt procurate în urma rezultatelor obținute experimental. Cînd o cultură bacteriană este oprită în creștere de către acumularea de produse metabolice toxice, cauza morții depinde de natura toxicului. Acizii organici, ca produși finali de metabolism, ar constitui unele din substanțele toxice. Explicația dată de unii autori, că singura cauză clară a morții bacteriilor este constituită din mutațiile letale, nu poate fi susținută, dacă ținem seama de numărul extrem de redus al mutațiilor în general, într-o populație microbiană. Această ipoteză demonstrează încă o dată cît de insuficiente sînt astăzi, cunoștințele noastre în această privință.

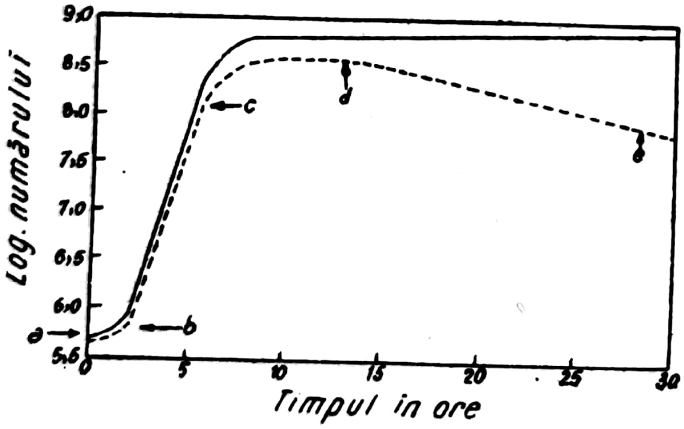


Fig. 39. — Curba de creștere a bacteriilor.

Linia continuă — numărul total de bacterii vii sau moarte; linia întreruptă — numărul de bacterii vii sau viabile; *a* — *b* — faza de lag; *b* — *c* — faza de multiplicare logaritmică; *c* — *d* — faza staționară; *d* — *e* — faza de declin.

Descrierea ciclului unei culturi bacteriene, cu fazele prezentate mai sus, este valabilă numai pentru culturi în medii lichide și în care nu se intervine în vreun fel oarecare asupra procesului de multiplicare. Nevoile impuse de cercetări de genetică și fiziologie bacteriană (în special studiul acumulării mutantelor într-o populație microbiană), sau cele impuse de obținerea pe cale industrială a unor vaccinuri, au determinat cultivarea germenilor în culturi continue, care în esență constă în menținerea, pe timp indefinit, a unei culturi microbiene în faza exponențială, germenii dezvoltați fiind recoltați pe măsura creșterii lor.

Culturile continue sînt obținute astăzi cu ajutorul unor aparate denumite Bactogen (Monod) sau Chemostat (Novick și Szilard). Aparatele funcționează pe principiul următor: o suspensie bacteriană conținută într-un recipient este alimentată cu un mediu de cultură convenabil,

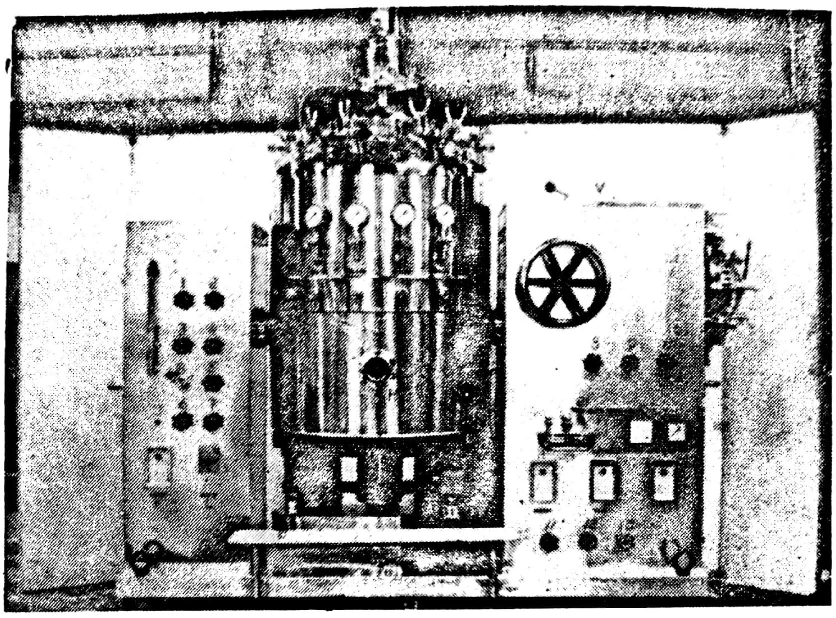


Fig. 40. — Aparat pentru culturi microbiene în profunzime.

proaspăt, într-o proporție stabilită de experimentator. Conținutul recipientului este amestecat și aerat prin barbotare. Suspensia bacteriană este îndepărtată din recipient în aceeași proporție în care intră mediul de cultură proaspăt, volumul suspensiei din recipient rămînînd constant.

În afară de folosirea culturilor continue, o cantitate mare de germeni vii pe unitatea de volum se poate dobîndi cu ajutorul culturilor aerate, în profunzime. Obținută cu ajutorul aparatelor de diverse modele, cultivarea în profunzime, este favorizată de menținerea permanentă a unui pH optim, precum și de adăugare de substanțe nutritive diferite, pe măsură ce acestea din urmă, sînt consumate de cultura de germeni în dezvoltare. Această metodă oferă o productivitate mare a creșterii bacteriene, întrecînd de 10—20 de ori productivitatea obișnuită, precum și o acumulare excepțional de mare a numărului de germeni vii pe unitatea de volum, care depășește de cîteva ori concentrația „M".

Cultivarea prin metoda culturilor aerate *în profunzime* determină o perioadă de lag de două ori mai scurtă, o viteză de înmulțire a germenilor mult mai mare, iar moartea bacteriilor apare mult mai încet. Acest procedeu, permițînd o diviziune a mai multor germeni pe unitatea de timp, cu toate că durata unei generații rămîne aceeași, permite o multiplicare considerabilă a germenilor, ceea ce ușurează mult prepararea pe cale industrială a vaccinurilor.

Metode folosite pentru studiul creșterii, multiplicării și morții bacteriilor

Măsurarea mărimii bacteriilor

Se confecționează un frotiu cu germenul de măsurat, care se fixează cu formalină sau acid osmic și care se colorează după procedeul May-Grünwald-Giemsa. Frotiul este examinat într-o cameră obscură cu imersia și un micrometru ocular cu indicatoare mobile. Se folosește o sursă de lumină punctiformă, monocromatică, obținută printr-un filtru verde și un condensator cu deschidere mare și centrare perfectă. Germenii pentru măsurătoare sînt aleși la întîmplare, iar numărul lor este mai mare sau mai mic, după gradul de variație a mărimii lor. Sînt măsurate, atît lungimea, cît și grosimea germenilor.

Numărătoarea germenilor vii

Se prepară din suspensia microbiană de cercetat diluții **1/100, 1/1 000, 1/10 000, 1/100 000, 1/1 000 000** etc. cu ajutorul soluției de clorură de sodiu 9‰. Se repartizează cîte 1 ml din fiecare diluție în cîte o placă Petri, peste care se adaugă 10 ml mediu agar 2%, topit și răcit la 45°, sau în raport cu exigențele de creștere a germenilor de numărat, un alt mediu solid (agar-sînge, agar-azid de sodiu etc.). Prin mișcări de rotație a plăcilor se asigură omogenizarea amestecului. Plăcile astfel preparate sînt incubate la 37°, timp de 24 de ore, după care se face citirea prin numărarea coloniilor dezvoltate, număr care se raportează la diluția respectivă. Numărătoarea se efectuează, de preferință la lupa Quebec. Nu vor fi citite decît plăcile care au dezvoltat sub 300 de colonii.

Numărătoarea totală (germeni vii și morți)

a) *Metoda Wright.* Se amestecă 1 ml suspensie microbiană (preparată în ser fiziologic), colorată cu o picătură de soluție apoasă 1% albastru de metilen, cu un volum egal de sînge uman (căruia i s-a determinat în prealabil bogăția în hematii) și cu 3 ml ser fiziologic. Se confecționează cîteva frotiuri cu acest amestec și se lasă să se usuce. Se examinează la un microscop prevăzut cu un ocular micrometric sau cadrilat. Printre hematii, germenii microbieni apar ușor colorați în albastru.

Se numără într-un număr de cîmpuri microscopice, pe de o parte, hematiile, pe de altă parte, germenii microbieni. Se stabilește raportul dintre hematii și germeni microbieni și se deduce numărul microbilor conținuți într-un ml de suspensie. Spre pildă : dacă se găsește o medie de 36 de hematii și 20 de germeni pe cîmpul microscopic ; dacă sîngele conține 5 milioane de hematii/ml și dacă X este numărul germenilor conținuți într-un ml de vaccin, avem :

$$X = 20 \times \frac{5\,000\,000}{36} = 2\,800\,000$$

b) *Determinarea corpilor microbieni uscaţi.* Suspensia microbiană căreia dorim să-i determinăm greutatea germenilor uscaţi este, mai întîi, măsurată printr-o metodă directă (metoda Wright). Pentru determinarea corpilor microbieni uscaţi, suspensia este preparată cu ajutorul apei distilate; prepararea ei cu ser fiziologic sau mediu de cultură obligă la calcule suplimentare, legate de prezenţa substanţelor minerale sau alte substanţe din aceste lichide.

Se prelevă din această suspensie un anumit volum, exact măsurat, care se trece într-o capsulă tarată. Se evaporează la etuva de 100°. După evaporare şi răcire, se cîntăreşte din nou. Greutatea obţinută indică ponderea corpilor microbieni uscaţi.

c) *Prepararea unui nefelometru pentru standardizarea vaccinurilor microbiene.* Se aleg 10 tuburi (diametru 7 mm sau 10 mm, cu acelaşi calibru; măsurătoarea se face cu 7 ml lichid colorat; se aleg tuburile unde lichidul a ajuns la acelaşi nivel). Se etichetează tuburile de la 1 la 10. Se prepară o soluţie 1% de clorură de bariu, chimic pură. Se trece 0,1 ml în tubul nr. 1; 0,2 ml în tubul nr. 2 etc., crescînd cu 0,1 ml la fiecare tub.

Se prepară o soluţie 1% de acid sulfuric chimic pur şi se adaugă în fiecare tub pînă la volumul total de 10 ml. Se închid tuburile la flacără.

În fiecare tub s-a format un precipitat alb de sulfat de bariu, cu opacitate diferită, crescînd de la 1 la 10.

Acest nefelometru corespunde aproximativ cu următoarele concentraţii de germeni în suspensie:

Tubul nr. 1 — 300 000 000
Tubul nr. 2 — 600 000 000
Tubul nr. 3 — 900 000 000

Tuburile următoare cresc fiecare cu 300 de milioane, în aşa fel, încît în tubul nr. 10 avem 3 miliarde.

Dacă vaccinul se prepară din culturi în bulion, este preferabil ca soluţia de acid sulfuric 1% să fie preparată tot cu bulion, ca să se obţină aceeaşi culoare.

Stabilitatea opacităţii preparaţiei descrise mai sus nu este totdeauna satisfăcătoare; după un timp, nu prea lung, opacitatea variază.

d) *Preparaţia internaţională de referinţă pentru opacitatea microbiană.* Datorită faptului că diferitele laboratoare de producţie a vaccinurilor corpusculare folosesc metode variate de estimare a densităţii suspensiilor microbiene, s-a simţit nevoia de a se avea la îndemînă o metodă unitară de apreciere a densităţii microbiene.

Pentru aceasta, Comitetul pentru standardizarea biologică a Organizaţiei Mondiale a Sănătăţii a stabilit o preparaţie internaţională de referinţă, care permite să se evalueze opacitatea suspensiilor bacteriene în aşa-numitele unităţi de opacitate (U.O.).

Preparaţia internaţională de referinţă a opacităţii este constituită dintr-o suspensie în apă distilată de particule de sticlă Pyrex, tratată prin agitare şi spălări consecutive, pînă cînd particulele de sticlă au o lungime de 1,5—3 μ. Concentraţia suspensiei hotărîtă de acest Comitet este egală cu 10 unităţi de opacitate. Eroarea acestei preparaţii de referinţă, faţă de suspensiile diferitelor vaccinuri corpusculare, nu depăşeşte 10% (1 unitate).

Numărul de germeni reprezentat de 1 unitate variază după specia microbiană.

Stabilitatea preparaţiei de referinţă a opacităţii este foarte satisfăcătoare; după mai mulţi ani de întrebuinţare, opacitatea sa nu a variat. După preparaţia internaţională de referinţă, care este repartizată de O.M.S. laboratoarelor producătoare de vaccinuri corpusculare, se pot prepara, pentru nevoi de lucru, subetaloane naţionale.

Acțiunea agenților fizici și chimici asupra bacteriilor

Conf. N. Pozsgi

Viața microbiană, datorită legăturii permanente și de strînsă interdependență cu mediul înconjurător, se desfășoară sub acțiunea complexului de factori fizici, chimici și biologici din mediu. Proprietățile morfologice și fiziologice ale microbilor suferă modificări sub influența acestora. Acțiunea agenților fizici și chimici este influențată de natura organismului (de caracterele de specie), de compoziția chimică, de faza de dezvoltare (vîrsta culturii), de structura microbiană (de forma vegetativă, sporulată, capsulată), de densitatea suspensiei microbiene etc. De asemenea, efectul acțiunii este determinat de intensitatea sau concentrația agentului, de timpul de expunere, de concentrația ionilor de H^+, de fenomenul de absorbție și adsorbție etc. Acest efect, în funcție de condițiile de acționare, poate fi stimulator, de atenuare, sau poate provoca apariția de variante sau distrugerea microorganismelor.

Efectul acțiunii lor poate fi reversibil, *bacteriostatic*, inhibînd înmulțirea, sau ireversibil, *bactericid*, *germicid*, producînd moartea.

Agenții fizici și chimici au o largă aplicare în practica sterlizării, cu scopul distrugerii totale a oricăror forme de viață, al dezinfecției, în obținerea de variante microbiene, de produse biologice (ex. vaccinuri), precum și în conservarea bacteriilor.

A. Agenții fizici

Temperatura. Căldura este agentul fizic cu cea mai largă aplicare în bacteriologie și cu urmările cele mai importante pentru studiul, cultivarea, variația și distrugerea germenilor.

Grupele bacteriene — uneori chiar speciile — diferă prin necesitățile lor de temperatură pentru creștere, ca și prin sensibilitatea lor față de căldură, fiind împărțite în mai multe categorii după cum se vede în tabelul III.

Tabelul III

	Temperatura			Tip ecologic
	minimă	optimă	maximă	
psihrofile sau criofile	aproximativ 0°	15—20°	30—35°	bacterii din apă
mezofile	„ 10°	30—40°	40—45°	bacterii mai ales patogene
termofile	„ 35°	50—60°	70—80°	bacterii din sol, apă, izvoare termale

1. Psihrofilele sau criofilele, adaptate la temperaturi joase, au o temperatură optimă de creştere sub 20° sau puţin peste.

2. Mezofilele au o temperatură optimă între 35 şi 40° ; printre aceşti germeni se includ microbii patogeni şi o parte dintre saprofiţi. Germenii patogeni sînt adaptaţi la temperatura corpului omenesc, dar şi printre aceştia sînt deosebiri : unii cresc în zone mai largi de temperatură 20—40° (exemplu : *Vibrio comma*, *B. anthracis*), alţii sînt sensibili chiar la variaţii mici de temperatură (de pildă : meningococul, pneumococul).

3. Termofilele constituie o grupă de bacterii adaptate la temperaturi mai înalte de creştere şi dezvoltare ; se caracterizează printr-o activitate biochimică exotermă intensă. Prin activitatea lor fermentativă, germenii termofili produc încălzirea fînului umed şi a turbei, purificarea biotermă a gunoaielor etc.

Starea fizică a coloizilor protoplasmatici, strîns legată de starea de dispersiune a lipidelor şi al efectului lor asupra permeabilităţii celulare, este hotărîtoare în stabilirea temperaturii minime.

Temperatura optimă este diferită, după felul activităţii bacteriene ; pentru multiplicare, producere de toxine, sporulare, temperatura optimă nu este totdeauna aceeaşi. La fel, această temperatură poate diferi pentru procesele de sinteză, fermentative, proteoliză etc.

Temperatura maximă este cea mai înaltă temperatură la care procesul biologic este încă posibil, determinată de stabilitatea moleculelor indispensabile ce alcătuiesc organismul.

Peste temperatura maximă ritmul reacţiilor chimice, mai ales cel al reacţiilor catabolice, este atît de crescut, încît produsele toxice de metabolism se acumulează în microorganism. Moartea prin căldură survine datorită denaturării proteinelor şi altor macromolecule, ca rezultat al rupturii legăturilor interatomice şi în primul rînd al celor de hidrogen, precum şi al acumulării produselor toxice de metabolism.

Speciile microbiene diferă ca rezistenţă la temperaturi extreme, datorită unor caractere legate de specie, de stadiul de creştere, de prezenţa sporilor, a capsulei etc. Rezistenţa germenilor este influenţată şi de alţi factori externi : pH (în medii acide sînt mai sensibile), starea de uscare, cantitatea de apă, densitatea microbiană etc.

Acţiunea temperaturii scăzute. Bacteriile, în genere, rezistă la temperaturi joase, încît rareori se realizează sterilizarea prin acţiunea temperaturilor scăzute. La această regulă fac excepţie cîteva specii bacteriene sensibile : meningococii şi gonococii, care mor la 0° în cîteva minute.

Alte specii microbiene : *S. typhi*, *Esch. coli*, *C. diphtheriae*, introduse în aer lichid (—186°), prezintă în primele zile o scădere a numărului de germeni vii cu persistenţa, în stare viabilă, a germenilor rezistenţi.

Prin congelare, speciile patogene îşi păstrează caracterele de patogenitate, gheaţa contaminată fiind o cale de transmitere a bolilor infecto-contagioase.

Prin acţiunea temperaturii scăzute, moartea bacteriilor pare datorită mai multor factori : 1) modificării stării coloidale a protoplasmei, ca urmare a cristalizării apei care produce lezarea mecanică a protoplasmei, concentrarea cristaloizilor, solventul separîndu-se din soluţie ; 2) îngheţării şi dezgheţării, mai ales dacă se efectuează repetat, metodă care duce la dezintegrarea celulelor bacteriene.

Suspensiile bacteriene, în cantităţi mici de bulion sau ser sanguin cu rol protector supuse acţiunii zăpezii carbonice (—78°) sînt rapid congelate, încît apa de constituţie, nemaiavînd timpul necesar să se cristalizeze, capătă un caracter amorf, vitros, care nu mai lezează protoplasma, macromoleculele nu se agregă, iar cristaloizii nu se concentrează atît de mult.

Deshidratarea în vid a culturilor congelate (procesul de liofilizare) constituie un mijloc foarte bun de conservare a culturilor (viaţa latentă a microbilor).

În practica curentă păstrarea culturilor se face la temperaturi cuprinse între +5 şi +10°, deoarece la aceste temperaturi procesele metabolice sînt scăzute, celula ducînd o viaţă latentă.

Acţiunea căldurii. Căldura are un efect mult mai distrugător asupra celulelor bacteriene. Temperatura maximă este mai apropiată de temperatura optimă de dezvoltare microbiană decît temperatura minimă. Prin acţiunea căldurii, procesele chimice şi fizice sînt mult accelerate ; la temperaturi cuprinse între +50 şi +100° moartea survine prin ruperea legăturilor intramoleculare. Prezenţa apei măreşte labilitatea legăturilor chimice. S-a constatat că unele legături dintre atomi sînt mai labile, de exemplu : legăturile între carbon şi carbon, între carbon şi oxigen, carbon şi sulf, carbon şi hidrogen, carbon şi azot. Ultima legătură este mai slabă. Prin ruperea acestor legături, mai ales a celor de hidrogen — care menţin proteinele şi alte macromolecule în stare nativă —, se denaturează protoplasma.

Moartea prin căldură este influenţată de caracterele de specie, compoziţia chimică, vîrsta culturii, pH, densitatea populaţiei microbiene, compoziţia mediului, produsele de metabolism etc. În general, formele vegetative ale bacteriilor patogene sînt omorîte la 50—70° în cîteva minute, numai cele termofile mai putîndu-se încă multiplica la 80°. Un factor deosebit în rezistenţa mărită a speciei microbiene este prezenţa sporilor endocelulari.

Faţă de forma vegetativă, sporii prezintă o compoziţie chimică deosebită ; diferenţele constau în natura proteinelor, lipidelor (conţin acid dipicolinic), conţinutul în săruri de calciu, procentul de apă etc.

Rezistenţa la căldură a sporilor este corelată cu natura membranei şi cu modul de germinare ; sporii care germinează fără o creştere mare în volum înainte de ruptura învelişului sînt cei mai rezistenţi. Rezistenţa sporilor este influenţată şi de compoziţia chimică a mediului.

Sporii de *B. anthracis* sînt omorîţi în apă la 100° în 1—12 minute, în aer cald, la 140° în 3 ore. Prezenţa apei este deci hotărîtoare. De exemplu, ovalbumina în soluţie apoasă coagulează la 56°, ovalbumina cu 25% apă coagulează la 74—80°, cu 18% la 80—90°, cu 6% la 145°. Bacteriile supuse aerului cald, deshidratîndu-se puternic, rezistă mai mult la acţiunea căldurii.

Transmiterea căldurii se realizează mai bine prin apă sau aerul umed, deoarece acestea prezintă o conductibilitate calorică superioară.

Moartea bacteriilor în aerul încălzit este în parte un proces oxidativ. Aceleaşi organisme încălzite în atmosferă de azot ori în vid mor mai tîrziu.

Moartea prin căldură, în prezenţa apei, este explicată prin mai multe ipoteze : 1) *denaturarea proteinelor, inclusiv a enzimelor* (este cea mai larg acceptată) ; 2) *asfixierea* — prin creşterea temperaturii ar creşte necesarul de oxigen şi în acelaşi timp s-ar reduce solubilitatea oxigenului — (nu explică moartea anaerobilor) ; 3) *intoxicaţia* — prin accelerarea ritmului reacţiilor protoplasmatice, care ajunge la otrăvire prin acumularea rapidă a produşilor de metabolism — (nu este valabil pentru endospori) ; 4) *eliberarea de lipide în soluţie* — ca urmare a căldurii, care ar schimba starea fizico-chimică a lipidelor din protoplasmă şi ar provoca denaturarea proteinelor, inclusiv a enzimelor.

Metode de sterilizare prin căldură : căldura este agentul fizic cu aplicarea cea mai largă şi mai eficientă în realizarea sterilizării, atît de necesară în activitatea bacteriologică, chirurgicală etc.

Arderea sau flambarea se aplică obiectelor care pot fi distruse sau încălzite la starea de incandescenţă (firul de platină al ansei, pipete Pasteur etc.).

Aerul cald — sterilizarea se obţine în camere sau cutii metalice cu pereţi dubli, încălzite printr-o sursă de căldură, prevăzute cu termometru şi termoregulator. Pentru sterilizare, obiectele se menţin la 170—180° timp de o oră. Rezistenţa bacteriilor la căldură creşte prin deshidratare ; de exemplu, *S. typhi*, care rezistă 30 de minute în vid la 115°.

Căldura umedă este mult mai eficace ; ea acţionează prin coagularea proteinei. Bacteriile, absorbind apa de condensaţie, devin mai bune conducătoare de căldură, ceea ce măreşte puterea de penetrare a căldurii.

Căldura umedă se aplică prin : 1) *fierberea apei* (100°), cu ajutorul căreia se pot steriliza seringi, ace, instrumente, în 10—15 minute ; sporii necesită un timp mai îndelungat (1—2 ore şi chiar mai mult) ; 2) *vapori fluenţi*, la presiunea atmosferică (100°) timp de 30—60 de minute ; sterilizarea fracţionată se realizează 3 zile consecutiv la 100°, cîte 15—30 de minute ; sporii, în intervalul dintre încălziri, germinează în cazul cînd materialul sterilizat oferă un mediu favorabil pentru germinare ; 3) *vapori sub presiune* (20—30 de minute la 120° şi 1 1/2 atm.), metodă foarte eficientă, folosită pentru sterilizarea tuturor materialelor, afară de acelea care se degradează ; sporii, care rămîn viabili mai multe ore în vaporii fluenţi, sînt omorîţi cu această metodă în cîteva minute. Vaporii saturaţi sînt cei mai eficace. Sterilizarea prin vapori sub presiune se realizează cu ajutorul autoclavului.

Uscarea în aer sau desicaţia. Prin îndepărtarea apei din celula bacteriană, în protoplasmă survin numeroase schimbări chimice şi fizice, printre care creşterea concentraţiei sărurilor şi denaturării proteinelor, inclusiv enzimele.

Formele vegetative ale bacteriilor, supuse procesului natural al uscării, mor în cîteva ore (pneumococul) sau în cîteva zile (bacilul tuberculozei). Forma vegetativă a unei bacterii care supraviețuiește procesului uscării, își poate păstra viabilitatea un timp îndelungat; endosporii fiind foarte rezistenți la uscare, supraviețuiesc în diferite medii naturale, timp îndelungat.

Desicația în vid a culturilor congelate prin zăpadă carbonică (—78°) în prezența unei soluții protectoare de proteine, este o metodă curentă pentru conservarea culturilor și a serurilor cu proprietățile lor originale.

Acțiunea radiațiilor. Radiația este definită ca propagarea sau transmiterea de energie prin spațiu. Propagarea se poate face prin mișcarea undelor, sau cu ajutorul particulelor atomice sau subatomice, care se mișcă cu viteză mare și sînt puse în mișcare de acțiunea cîmpurilor electrice sau prin expulzarea din substanțele radioactive. Efectele radiațiilor sînt produse numai de energia radiantă absorbită de corpul bacterian și de calitatea radiațiilor absorbite. Radiațiile sînt absorbite în unități minimale de energie, numite cuante. Energia cuantei este invers proporțională cu lungimea ei de undă, iar numărul cuantelor absorbite este proporțional cu produsul intensității și durata radiației. Efectele sînt dependente deci de: lungimea de undă, mărimea sursei și durata expunerii; în funcție de aceste variante se pot stimula funcțiile fiziologice sau se poate provoca moartea.

Energia cuantei absorbite fiind mare, provoacă creșterea vibrațiilor interatomice sau excitația electronilor cu deplasarea lor pe alte orbite, dînd naștere unor atomi sau molecule activate, iar expulzarea de electroni dînd naștere ionizării. Molecula se poate rupe la nivelul unor legături chimice, se pot forma noi legături intermoleculare, sau energia se transmite, prin ciocniri, moleculelor vecine. Studii ale soluțiilor de acizi nucleici și de proteine supuse acțiunii radiațiilor ultraviolete arată depolimerizarea și dezagregarea lor.

Prin expunerea celulelor la acțiunea radiațiilor ionizante cînd cuanta absorbită are o energie peste 5 electronvolți, se constată ruperea legăturilor de hidrogen, oxidarea legăturilor nesaturate, depolimerizarea, polimerizarea; de exemplu acizii nucleici se depolimerizează sub acțiunea ionilor rezultați prin disociația peroxidului de hidrogen, mai ales a ionului HO_2^- rezultat din iradierea apei intracelulare sau extracelulare în prezența oxigenului molecular, care va provoca creșterea concentrației nucleotidelor citoplasmatice, bacteria deshidratată este mai rezistentă la radiații. După Kusin și Krusanova, prin repolimerizarea produselor de scindare (a nucleotidelor) rezultă polimeri cu aceeași greutate moleculară, dar cu structură diferită de cea specifică, care vor provoca modificări importante în procesele ulterioare iradiației (fig. 29). Injectări de doze mari de nucleotide la șoarece au fost urmate de efecte asemănătoare acelora induse cu doze mari de radiații X, de raze ultra-

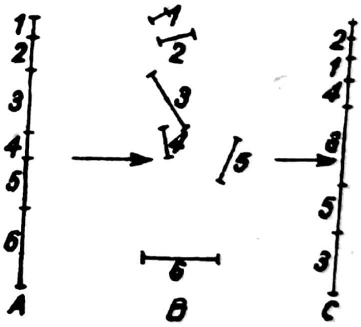


Fig. 41. — Schema modificării structurii acidului dezoxiribonucleic (ADN).

A – molecula originală ADN; *B* – fragmentele rezultate din depolimerizarea ADRN; *C* – noua moleculă de ADN.

violete. Partea celulei microbiene cea mai sensibilă față de radiații este reprezentată de aparatul nuclear cu acizi dezoxiribonucleici — a căror lezare duce la apariția de mutații.

Moartea, ca efect al radiațiilor, este explicată prin următoarele ipoteze: a) inactivarea enzimelor; oprirea sintezei enzimelor; b) producerea de substanțe chimice cu acțiune otrăvitoare, ca rezultat al descompunerii materialului celular (acizi nucleici, proteine, lipide, hidrocarbonate) sau a componentelor din mediu cu formare de H_2O_2, O_3, uleiuri, hidrocarbonate cu compoziție chimică necunoscută.

Acțiunea radiațiilor luminoase. Spectrul luminii vizibile se întinde de la lungimea de undă de 4 000 Å (violet) la 7 500 Å (roșu) (1 unitate Angström este A = 10^{-8} cm sau 0,1 milimicroni „mμ").

Efectul bactericid al luminii solare a fost măsurat prima dată de Downes și Blunt în 1877, iar Koch a stabilit efectul letal asupra bacililor tuberculozei. Roux, în 1887, a expus acțiunii luminii solare spori de *B. anthracis*, în bulion, în strat de 5 mm grosime, timp de 3—4 ore. Bulionul suferă modificări chimice care inhibă germinarea sporilor. Burnet în 1925, constată de asemenea că pe plăcile de agar expuse acțiunii luminii solare nu se dezvoltă stafilococi, inhibiția fiind atribuită producerii peroxidului de hidrogen în mediu.

Efectul bactericid crește cu descreșterea lungimii de undă de la roșu-violet-ultraviolet. În zona ultravioletă efectul bactericid crește, începînd de la lungimea de undă de 4 000 Å, pînă la 2 650—2 700 Å, cînd atinge maximul. De la 2 650 Å pînă la 2 400 Å activitatea bactericidă descrește ușor, constatîndu-se o nouă creștere la 2 000 Å. Eficacitatea bactericidă maximă este de 2 650—2 700 Å care corespunde cu absorbția maximă a razelor de către materialul nuclear și în special de către acizii nucleici. Procesul chimic, determinat de radiațiile ultraviolete, este necunoscut și se face în absență de oxigen.

Este un paralelism între absorbția razelor ultraviolete de către acizii nucleici și proteine și efectul letal al radiațiilor respective. Rezultatul acțiunii este moartea bacteriilor.

Pentru producerea de raze ultraviolete se utilizează lămpi diferite cu vapori de mercur. Razele ultraviolete sînt folosite pentru sterilizarea aerului încăperilor, a suprafețelor de metal, sticlă, precum și a apei de băut în unele uzine centrale de aprovizionare cu apă etc.

Alt efect al razelor ultraviolete este producerea de ozon (O_3) în aer și de peroxid de hidrogen (H_2O_2) în apă, în medii de cultură etc.

Sensibilizarea fotodinamică. Efectul razelor vizibile poate fi mărit prin fenomenul de fotosensibilizare dinamică a bacteriilor, astfel ca raze înainte nenocive să devină sterilizante. Substanțe colorante, ca: eozina, fluoresceina, primulina, albastrul de metilen etc., introduse într-o suspensie bacteriană și expuse razelor solare, provoacă moartea bacteriilor la concentrații mult mai mici decît cele folosite în suspensiile păstrate la întuneric. Efectul nociv se explică prin reținerea un timp mai îndelungat a razelor absorbite de către coloranți. Această reținere este urmată de eliberarea într-o singură unitate a unei importante fracțiuni din energia absorbită, prin radiații fluorescente ori prin transfer de energie, datorite ciocnirilor dintre moleculele de coloranți cu cele protoplasmatice. Concomitent se constată şi formarea peroxidului de hidrogen. Aceste reacţii fotodinamice se fac în prezenţa oxigenului.

Lumina vizibilă poate fi bactericidă — datorită apariţiei pe cale fiziologică de substanţe fotosensibilizante (porfirine, flavine).

Fotoreactivarea. O cultură microbiană expusă un interval de timp razelor ultraviolete va supravieţui în parte, şi această proporţie de supravieţuire va fi cu mult mai mare dacă la scurt timp după prima acţionare bacteriile sînt expuse acţiunii luminii vizibile — solare — sau unei lămpi incandescente. Acest proces de revenire a celulelor inactivate sub acţiunea razelor ultraviolete este cu atît mai activ, cu cît intervalul scurs de la expunerea iniţială este mai scurt. Lungimile de undă cele mai eficace sînt peste 5 100 Å în partea galbenă a spectrului. Proporţia de supravieţuire prin fotoreactivare este crescută pentru *Esch. coli* de 27 000 de ori, iar mecanismul necunoscut.

Acţiunea razelor X şi a radiaţiilor elementelor radioactive. Razele X (raze electromagnetice), razele γ, razele β sau razele catodice (electroni de mare viteză), razele α (nuclei de heliu) şi neutronii, reprezintă radiaţiuni cu valori mari de energie cu efecte sterilizante, datorită absorbţiei şi ciocnirii particulelor cu componentele mediului celular intern, producînd ionizarea moleculelor bombardate.

Acţiunea ionizantă — bactericidă — merge crescînd de la razele $\beta < \gamma <$ X neutroni $<$ razele α.

Unele dintre aceste raze ionizante acţionează prin formarea peroxidului de hidrogen, acidului formic, inactivarea proteinelor inclusiv a enzimelor, de exemplu inactivarea ribunocleazei de către radicalii hidroxilici produşi de acţiunea razelor X asupra apei, sau prin inactivarea altor enzime de către alţi radicali, produşi sub acţiunea diferitelor radiaţii ionizante. Radiaţiile ionizante împiedică în primul rînd diviziunea celulară, mai mult decît creşterea, fiind aplicate în tratamentul afecţiunilor neoplazice.

Undele sonice. Termenul de super- sau ultrasonic este atribuit la frecvenţe peste 200 000 cicli/sec. Sunetul auzibil este de frecvenţa sub 9 000 cicli/sec. Undele supersonice, determinînd liza celulei bacteriene, au efect bactericid.

Generatoarele piezoelectrice — formate din cristale de cuarţ — sînt transformatori ai energiei şi oscilaţiilor electrice în energie şi oscilaţie sonică. Undele supersonice produse de oscilaţiile piezoelectrice sparg membrana celulară, coagulează şi dispersează conţinutul intracelular. În celulele mari, expuse undelor supersonice, se observă o mişcare activă a conţinutului celular, care în corpul bacterian poate să nu apară. Agitarea foarte vie a conţinutului protoplasmatic intracelular duce la alterarea stării coloidale normale şi la moartea celulei bacteriene. Ruperea şi golirea celulei bacteriene (fenomenul cavitaţiei) se mai datoreşte formării în mediu de bule mici de gaze dizolvate, mişcării lor energice sub acţiunea undelor supersonice şi a izbirii lor de membranele celulare.

Presiunea. Celula animală, vegetală şi bacteriană trebuie considerată, din punct de vedere fizico-chimic, ca o soluţie de substanţe diferite, despărţite printr-o membrană semipermeabilă de mediul în care se găseşte. Prezenţa acestei membrane între două soluţii cu concentraţii diferite, cu rol în schimburile celulă-mediu, duce la apariţia fenomenului de osmoză.

Presiunea osmotică variază cu specia microbiană. Permeabilitatea variază cu specia bacteriană şi cu vîrsta celulei. Celulele tinere sînt mai sensibile la variaţiile de concentraţie a sărurilor din medii. Sporii sînt mult mai puţin sensibili.

Bacteriile, ca şi celulele în general, trecute în soluţii de săruri concentrate (în mediu hipertonic), dau fenomenul de plasmoliză. Trecute în soluţii diluate — hipotonice — se constată turgescenţa. Cînd este aceeaşi concentraţie în interiorul celulei şi în mediu extern, se realizează soluţii izotonice.

Presiunea osmotică influenţează metabolismul, morfologia bacteriană. Pentru o tulpină dată există o presiune osmotică optimă. Bacteriile se pot adapta treptat la presiuni osmotice variate; în schimb, variaţii bruşte de la o presiune osmotică înaltă la una mai joasă sînt mortale mai ales pentru celulele tinere.

În condiţii naturale bacteriile pot trăi în ape cu concentraţii ridicate de săruri (apa de mare, a unor lacuri etc.); sînt aşa-numitele bacterii osmofile sau halofile. Halofilele din Marea Moartă trăiesc la o concentraţie de aproximativ 29% săruri; sînt halofile obligatorii.

În primele stadii de dezvoltare, presiunea osmotică este mare datorită sintetizării de substanţe, cu greutate moleculară mică, care vor servi la sinteza substanţelor cu greutate moleculară mare: glucide, lipide, proteine.

Presiunea mecanică. Bacteriile sînt foarte rezistente, la presiunea mecanică; formele vegetative mor la 6 000 atmosfere în 14 ore, sporii la 12 000 atmosfere. În general presiunea hidrostatică schimbă vîscozitatea şi elasticitatea protoplasmei, ritmul proceselor metabolice. Moartea survine prin coagularea proteinelor protoplasmatice. Astfel, albuşul de ou, supus unei presiuni de 5 000 atmosfere, coagulează după 30 de minute de expunere. Forme bacteriene marine cresc în condiţii naturale la 500—600 atmosfere.

B. Agenţi chimici

a) **Agenţii chimici care acţionează prin denaturarea coloizilor proteinici, inclusiv a enzimelor.** Din grupa aceasta fac parte: acizii, alcalii, alcoolii etc. care denaturează, alterînd parţial sau total starea coloidală a proteinelor protoplasmatice.

1. *Acizii* şi *alcalii.* Acţiunea lor dezinfectantă este legată de disociaţia electrolitică şi de concentraţia ionilor de H^+ şi OH^- sau de molecula nedisociată; aceştia îşi exercită acţiunea de obicei în afara limitelor de pH 5 şi pH 9.

Sensibilitatea germenilor la acţiunea agenţilor de mai sus este diferită: H_2SO_4, HCl etc. au acţiune dezinfectantă asupra unei suspensii de *Esch. coli*, într-o concentraţie de 0,01 N în 40 de minute; genul *Mycobacterium* este mult mai rezistent, datorită structurii sale şi se întrebuinţează acizi şi alcalii pentru distrugerea selectivă a microorganismelor neacidorezistente.

Unii dintre acizii minerali acţionează şi ca oxidanţi, de exemplu: acidul nitric, acidul bicromic, acidul clorhidric.

Unii alcali, ca $Ba(OH)_2$, deşi mai puţin disociaţi, sînt mai toxici, datorită ionului metalic care completează activitatea germicidă a ionului hidroxilic.

Acizii organici, deşi prezintă o disociaţie mult mai redusă, se prezintă totuşi ca dezinfectanţi foarte activi. Probabil că alături de ionii de H acţionează întreaga moleculă sau radicalul organic (anionul) cu mare afinitate pentru proteinele celulei bacteriene. Membrana celulei manifestă o mai mare permeabilitate faţă de moleculele neionizate de acizi organici.

În cursul activităţii metabolice a bacteriilor se acumulează acid lactic şi alţi acizi organici, care inhibează, parţial sau total, creşterea lor.

Pentru dezvoltarea fiecărei specii microbiene există o concentraţie optimă a ionilor de H, necesară creşterii şi dezvoltării lor, de exemplu: *Esch. coli* necesită pH 7,6; *Vibrio comma* pH 8.

2. *Alcoolii.* Puterea lor dezinfectantă creşte paralel cu greutatea moleculară sau cu lungimea lanţului alifatic; alcoolul izopropilic este mai eficace decît cel etilic, iar acesta, mai activ decît cel metilic.

Alcoolii sînt agenţi fixatori ai celulei; concentraţia de 50–70% este cea mai activă ca acţiune bactericidă. Se folosesc ca dezinfectanţi ai pielii. Alcoolul etilic măreşte efectul dezinfectant al clorurii mercurice şi reduce efectul fenolului şi al formolului.

Glicerolul în concentraţie de peste 50% este bacteriostatic şi este conservant pentru unele virusuri (vaccina).

3. *Sărurile* exercită o acţiune fizico-chimică în raport cu concentraţia, iar speciile bacteriene prezintă o variată comportare faţă de acţiunea lor. Astfel, NaCl opreşte creşterea bacilului tuberculozei la o concentraţie de 2%, a *Esch. coli* la o centraţie de 6%, iar stafilococul creşte la o concentraţie de 12–15% NaCl.

Sărurile, în cantităţi mici, stimulează dezvoltarea germenilor microbieni, iar în concentraţii mai mari au acţiune inhibitoare sau toxică. Pe baza acţiunii antagonice a sărurilor s-au realizat diferite soluţii nutritive (Ringer, Tyrode etc.).

Acţiunea toxică a sărurilor are loc prin modificarea permeabilităţii membranei, a stării coloidale a protoplasmei, inclusiv a enzimelor, şi prin modificarea sarcinii electrice a bacteriei.

b) **Agenţi chimici care acţionează prin interferenţă cu grupările active ale proteinei.** Proteinele, şi mai ales enzimele, au un număr de grupări chimice reactive, esenţiale pentru activitatea enzimelor: de exemplu, grupările carboxilice, aminice, sulfhidrilice, fenolice, imidazolice etc.

Constituienţii proteici ai protoplasmei, prin intermediul grupelor active, intră în combinaţii cu agenţii chimici, ceea ce duce la alterarea proteinei.

Sărurile de mercur se combină cu grupările sulfhidrilice, formolul, coloranţii acizi reacţionează cu grupările bazice amino- şi imidazolice, iar coloranţii bazici şi compuşii de amoniu cuaternari se combină cu grupările acide etc.

Efectul sărurilor metalelor grele scade în medii care conţin materiale organice, proteine, cu grupări active libere.

1. *Eficacitatea ionilor metalici de mercur, argint, cupru* este în raport cu disociaţia electrolitică şi toxicitatea ionului metalic. Prezintă acţiune oligodinamică, datorită marii afinităţi a unor proteine pentru aceşti ioni.

Mercurul este în general toxic pentru enzimele şi proteinele care conţin grupările SH, reacţia fundamentală avînd loc între ionul Hg şi grupările SH. Acţiunea ionului metalic este reversibilă în cazul cînd se adaugă mediului tioglicolat, glutation sau alte substanţe cu grupări SH, care pot disloca Hg prin competiţie; acţiunea bactericidă a ionului de mercur este mult inhibată sau anulată total prin acţiunea simultană a substanţelor cu grupări SH.

Mercurul inhibează creşterea şi reproducerea microorganismelor, şi aceasta depinde de timpul de expunere, concentraţia substanţei dezinfectante şi temperatură.

Clorura mercurică în soluţie 1/1 000 este un foarte puternic bactericid.

Mercurialele se utilizează din ce în ce mai limitat, ca dezinfectante, deoarece siguranţa în acţiunea lor bactericidă este mică, ionii de Hg combinîndu-se cu grupările active ale substanţelor proteice din mediul de acţionare.

Preparatele organomercuriale (compuşii organici de mercur) sînt valoroase prin calităţile lor antiseptice pentru piele şi mucoase căci permit o slabă disociaţie a ionului de mercur nefiind iritante, şi prin calităţile lor de agenţi conservanţi în producţia de vaccinuri; de exemplu: mertiolatul de sodiu, metafenul au proprietatea de a păstra calităţile antigenice ale produselor.

Argintul este toxic pentru celulă. Acţiunea este datorită probabil proprietăţii catalice oxidative, fie adsorbţiei sub formă coloidală sau ca ion metalic pe suprafaţa celulei, fie formării de săruri organometalice (săruri complexe, proteinat de argint). S-a demonstrat că argintul inhibează în primul rînd activitatea enzimatică. Azotatul de argint în soluţie de 1% este folosit pentru instilaţii în ochi la nou-născuţi, pentru prevenirea oftalmiei gonococice.

Cuprul, mai ales sub formă de sulfat de cupru, se foloseşte ca fungicid.

2. *Agenţii chimici care acţionează ca oxidanţi*. Substanţele oxidante slabe atacă şi transformă grupările sulfhidrice — SH — ale proteinelor active, în grupări S—S oxidate, iar oxidanţii puternici acţionează asupra grupărilor fenolice, indolice, aminice.

Halogenii (Cl, Br, I) în stare liberă sînt foarte toxici pentru celula bacteriană. Halogenii acţionează, fie ca oxidanţi clorul cu apa formînd acid hipocloros (HOCl), fie prin halogenarea moleculei proteice.

Oxidarea glucozei în celula bacteriană este oprită de prezenţa clorului, care distruge enzima triozo-fosfat-dehidrogenaza şi inactivează aldoloza la *E. coli*.

La dezinfecţie se folosesc clorul gazos (2—3 mg/1 000 ml, apă de băut), hipocloritul de calciu, cloramina (soluţie 1%).

Iodul se foloseşte sub formă de tinctură de iod, care conţine 2% iod metalic, 2,4% iodură de potasiu dizolvate în alcool diluat (aproximativ 46%). Este un foarte bun dezinfectant al pielii; se foloseşte de asemenea pentru conservarea catgutului, în condiţii sterile.

Puterea bactericidă a iodului este foarte puţin alterată de prezenţa în mediul ambiant a materiilor organice. Este folosit în locul clorului, pentru dezinfecţia unor cantităţi mici de apă.

Peroxidul de hidrogen (H_2O_2) în concentraţie de 3% este un foarte bun antiseptic, dar cu acţiune scurtă, fiind descompus de catalazele unor bacterii şi ţesuturi.

Permanganatul de potasiu ($KMnO_4$) în diluţie 1‰ este un bun dezinfectant, folosit în unele afecţiuni urologice, spălarea rănilor etc.

Coloranţii bazici din seria trifenilmetanului : violetul de genţiana, cristal-violetul, verdele briliant, verdele de malahit, coloranţii din seria chinoleinică, compuşii acridinei, acţionează în mod selectiv, inhibînd multiplicarea a 90% din bacteriile gram-pozitive, 10% din bacteriile gram-negative. Coloranţii acizi (de exemplu, fucsina acidă) sînt mult mai puţin eficienţi.

Bacteriile gram-pozitive au un punct izoelectric mai scăzut decît cele gram negative. De aci rezultă că bacteriile gram-pozitive se combină mai activ cu coloranţii bazici, iar cele gram-negative, cu coloranţii acizi.

Acţiunea antibacteriană este echivalentă cu mecanismul coloraţiei, formîndu-se săruri ale colorantului cu componenta acidă sau bazică a protoplasmei celulare. Coloranţii acizi reacţionează în celulă cu grupările bazice, formînd compuşi slab ionizaţi, iar aciditatea rezultată nu mai este compatibilă cu viaţa.

$$P - NH_2 + Na^+A^- + H_2O \rightleftarrows P - NH_3A + Na^+ + OH^-$$

($P—NH_2$ este componenta de bază a celulei şi A^- anionul colorantului acid).

Coloranţii bazici sînt mult mai eficienţi, datorită afinităţii faţă de gruparea acidă a acidului fosforic al nucleo-proteinelor. Producerea acestei reacţii a fost demonstrată prin observaţii microscopice ale localizării în structura nucleară a celulelor din ţesuturi.

Un rezultat deosebit de important al cercetărilor în legătură cu aplicarea coloranţilor în terapie (Domagk, 1932) a fost descoperirea transformării în organism, prin reducere şi scindare, a prontozilului, colorant diazo, în paraamino-benzen sulfamidă (Tréfouël). Cu aceasta s-a creat baza sintezei sulfamidelor, clasă foarte importantă de chimioterapice.

3. *Agenţi chimici cu acţiune reductoare. Formolul* (H_2CO) se găseşte în comerţ în soluţie apoasă 37%, este foarte puţin selectiv; este mult mai activ în atmosferă saturată cu vapori de apă.

Se combină şi blochează grupările NH_2 ale aminoacizilor din proteine, inactivînd cele mai multe enzime din acizii nucleici, la pH 9,5 sau la pH mai alcalin, formînd punţi de legătură de metilen, între molecule; la pH 6 atacă azotul (N) din inelul imidazolic al histidinei, iar la pH 5 sau inferior se fixează de grupările amido şi guanidil. Formolul are capacitatea de a reacţiona cu foarte variate grupări mai ales cu NH_2 şi OH.

Prin combinarea cu grupările active (mai ales NH_2, OH) ale toxinelor bacteriene, se ajunge la detoxificarea lor, cu păstrarea antigenităţii.

Se mai utilizează ca fixator şi conservant de ţesuturi pentru studii microscopice, pentru îmbălsămare etc.

Oxidul de etilen (C_2H_4O), este mult mai eficient decît formolul. Această substanţă sterilizează în 4 ore un material, la umiditatea relativă a mediului ambiant, la temperatura camerei şi la o înaltă concentraţie (442 mg/l). Oxidul de etilen acţionează printr-un proces de alkilare a compuşilor organici, mai ales a proteinelor. Atomul de H labil, prezent în grupările COOH, NH_2, SH, OH ale proteinelor, se fixează pe oxigenul oxidului de etilen şi se formează hidroxietilen ($-CH_2-CH_2-OH$), radical care se leagă de molecula compusului organic în poziţia rămasă liberă prin fixarea hidrogenului. Înlocuirea H prin radicalul hidroxietil ar bloca efectiv grupările reactive din proteinele bacteriene, cauzînd moartea.

c. **Agenţi chimici care acţionează prin alterarea permeabilităţii peretelui celular.** Aceste substanţe cu acţiune de suprafaţă distrug semipermeabilitatea membranei celulare, provocînd dereglarea permeabilităţii şi alterarea conţinutului protoplasmatic cu pierderea N şi P din corpul bacterian, cu scăderea concentraţiei de metaboliţi intracelulari, uneori liza peretelui celular.

Detergenţii sintetici sînt substanţe valoroase, cu acţiune de suprafaţă; au în molecula lor două grupări: una solubilă în grăsimi (hidrofobă) şi alta solubilă în apă (hidrofilă).

În general grupele hidrofile sînt polare, ionizabile, sau molecula este electric asimetrică; grupele hidrofobe (lipofile) sînt electric simetrice şi nu ionizează, exemplu radicalii hidrocarburi.

Activitatea de suprafaţă — prin micşorarea tensiunii superficiale nu apare decît în compuşi cu catene hidrocarbonate ($-R$) mai lungi de C_8, grupul cel mai important este format din baze cuaternare cu lanţuri lungi de carbon cu o grupare activă, hidrofilă, care este cationul de amoniu cuaternar. Cei patru atomi de hidrogen sînt înlocuiţi cu radicali arilici sau alifatici de diferite lungimi ($R_4\ N^+$).

În soluţii apoase, ca rezultat al disociaţiei, se formează cationi cu încărcătură pozitivă (radicalul amoniu), care migrează şi se adsorb pe suprafaţa membranei celulare. Se constată o pierdere a încărcăturii negative, fiind înlocuită cu încărcătura pozitivă a cationilor. Rezultă distrugerea semipermeabilităţii membranei celulare, cu pierderea din celulă a N şi P şi cu pătrunderea în interior a substanţei, care va determina denaturarea proteinelor active, disocierea proteinelor conjugate şi liza peretelui celular.

La *St. marcescens* marcat cu C^{14}, supus acţiunii compuşilor cuaternari de amoniu, s-a văzut că efectul bactericid este cauzat de ruperea şi liza membranei celulare. La o concentraţie joasă se constată o interferenţă cu reacţii producătoare de energie, precum şi cu creşterea şi reproducerea bacteriană.

Agenţii cationici sînt mai activi la pH alcalin, unde vor precipita proteinele care au punct izoelectric negativ.

Detergenţii cationici sînt activi la o concentraţie de 1 : 3 000 pînă la 1 : 30 000, cu eficacitate egală faţă de germenii gram-pozitivi şi gram negativi. Au o largă utilizare în industria textilă, alimentară, de băuturi etc., datorită lipsei lor de toxicitate.

Zefirolul (alkildimetilbenzilamoniu clorur, Domagk, 1955) este primul compus dintr-o clasă foarte numeroasă a detergenţilor sintetici cu activitate de suprafaţă. Este folosit în secţiile chirurgicale, în concentraţie de 1 :1 000, ca antiseptic al pielii.

Printre detergenții aniotici sînt compuși care au în general grupul hidrofilic reprezentat prin sulfat $R-SO_4H$, prin sulfonat $R-SO_3H$ ori $R-COOH$, iar prin disociație eliberează ioni negativi (anioni) răspunzători de efectul toxic ($R-SO_4^-$, $R-SO_3^-$, $R-COO^-$) și unde R poate fi foarte variat.

De exemplu $C_{16}H_{33}SO_3Na \rightleftarrows C_{16}H_{33}SO_3^- + Na^+$
hidrofob = hidrofil
cetilsulfat de sodiu

Detergenți anionici sînt săpunurile (săruri de Na și K ale acizilor grași) și acizii grași. Acțiunea dezinfectantă a săpunurilor este datorită alcalilor și acizilor grași. Acizii grași nesaturați, cu lanț lung oleic, linoleic, liber sau ca săpun, au acțiune bactericidă sau bacteriostatică asupra multor bacterii. Săpunurile de K sau Na ale acizilor oleic sau linoleic în concentrație de 1 : 500 — 1 : 5 000 lizează pneumococul. Streptococii, bacilii difterici, bacilii tuberculoși au o sensibilitate asemănătoare. Au eficacitate mai mare față de germenii gram pozitivi, acționează mai bine la pH acid, unde proteinele au o sarcină pozitivă și agenții anionici reacționează cu proteinele pe care le precipită.

Săpunurile prezintă o puternică acțiune selectivă față de bacterii; majoritatea germenilor patogeni, izolați din aparatul respirator, sînt omorîți mai ușor de săpunurile acizilor grași nesaturați, pe cînd majoritatea germenilor patogeni intestinali sînt mai sensibili față de săpunurile acizilor saturați.

Se consideră că săpunurile acționează asupra porțiunii lipidice a membranei semipermeabile a celulelor.

Fenolii și crezolii se obțin din gudronul rezultat din distilarea cărbunelui.

Fenolul (C_6H_5OH) este unul din cei mai vechi dezinfectanți, dar nu este prea larg folosit. În soluție de 1—2% omoară cele mai multe forme vegetative, în concentrație de 0,5% este folosit la conservarea vaccinurilor și serurilor; ClNa îi mărește eficacitatea, iar alcoolul etilic i-o reduce.

Prin introducerea de grupări alifatice în inelul benzenic (de exemplu metil) se obțin crezolii (orto-, meta- și paracrezolii) cu eficacitatea crescută. De asemenea, dacă în inelul benzenic se introduc halogeni, prin substituție, crește activitatea bactericidă; aceeași acțiune se obține prin adaos de săpun de K.

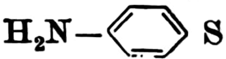
Aceste substanțe dezinfectante adsorbite pe suprafața celulei bacteriene în concentrație mare produc liza peretelui celular, cu pierderea aminoacizilor și a altor metaboliți principali. Alte cercetări arată că acești compuși pot inactiva sistemul enzimatic, mai ales dehidrogenazele și oxidazele.

Aprecierea valorii bactericide a unui dezinfectant. Pentru a stabili valoarea unui dezinfectant se compară acțiunea bactericidă a dezinfectantului cercetat cu aceea a fenolului (coeficientul fenolic) față de tulpini standard de *Salmonella typhi* și *Staphylococcus aureus*. Metodele folosite pînă în prezent sînt: a) metoda firelor de mătase cu spori de *B. anthracis* (R. Koch); b) metoda picăturii Rideal-Walker, în care cantități similare de germeni sînt supuse acțiunii unor concentrații de fenol și a dezinfectantului de testat și apoi însămînțate pe un mediu de cultură la anumite intervale și c) metoda Chick-Martin, în care dezinfectanții nu sînt folosiți în soluție pură, căutîndu-se reproducerea condițiilor din natură.

Acțiunea agenților chimioterapici. Prin chimioterapie se înțelege folosirea anumitor substanțe chimice cu scopul de a inhiba și distruge germenii patogeni în organismele infectate.

Primele încercări de tratament al animalelor infectate experimental au fost făcute de L. Pasteur și R. Koch. Întemeietorul chimioterapiei experimentale moderne este însă P. Ehrlich. El a pornit de la ideea că asupra celulelor acționează acele substanțe care intră în combinație cu protoplasma celulelor (teoria chimică) și a presupus că microorganismele dispun de grupări chimice specifice — catenele laterale sau chimioreceptorii —, care intră în combinații stabile cu moleculele substanțelor respective, provocînd efectul chimioterapic.

Cele mai noi cercetări au pus bazele teoriei antagonismului concurent, a interferenței dintre substanțele chimioterapice și produsele vital necesare metabolismului celular. S-a constatat rolul unui factor conținut în celulele drojdiei de bere care inhibează acțiunea sulfamidei; acest factor este acidul paraaminobenzoic (Woods). Moleculele substanței chimioterapice sînt foarte asemănătoare ca structură cu ale metaboliților esențiali (ale substanțelor de creștere) și pot ocupa locul lor prin competiție în reacțiile complicate de sinteză care au loc în celulă; metabolismul normal suferă și se oprește înmulțirea microbilor. În aceste cazuri, substanța chimioterapică este considerată un imitator antagonist al metabolitului esențial.

Astfel, sulfamidele adevărate au o mare asemănare structurală prin porțiunea activă a moleculei  cu acidul paraaminobenzoic (APAB), pe care-l înlocuiesc în sistemele enzimatice esențiale, tulburînd procesul normal (Woods și Fildes), sau inhibă sinteza unor substanțe în constituția cărora se găsește APAB. Acidul paraaminobenzoic introdus în acidul folic (APG acidul pteroilglutamic) îi conferă funcția de coenzimă, cu rol de transportor de carbon în sinteza unor aminoacizi, a bazelor pirimidinice, purinice a nucleotidelor a vitaminei B_{12}. Sulfamidele prin interferența cu APAB inhiba tocmai sinteza acestor compuși pteroilglutamici. Acidul paraaminobenzoic, în cursul sintezei bacteriene, poate fi înlocuit cu o moleculă de sulfamidă și în acest caz acidul folic, cu rol de coenzimă, nu poate cataliza, printre altele, formarea purinelor și pirimidinelor necesare în sinteza acizilor nucleici, de care au nevoie bacteriile. Sulfamidele acționează mai ales în perioada logaritmică de creștere a bacteriilor.

Adăugarea acidului paraaminobenzoic, în cantități infime (1 : 26 000 — 1 mg APAB la 26 g sulfamidă), inhibă acțiunea sulfamidei. Novocaina (ester al APAB) are o acțiune asemănătoare; administrarea simultană a novocainei și a sulfamidelor este contraindicată.

Chimioterapia, cu ajutorul căreia se intervine eficace în foarte numeroase cazuri de infecții grave, altădată mortale, constituie azi o armă indispensabilă pentru prevenirea și combaterea bolilor infecțioase. Folosirea largă a chimioterapiei a contribuit la creșterea, cu aproape 10 ani, a duratei medii de viață.

În urma administrării sulfamidelor se constată apariția chimiorezistenței prin : 1) creșterea capacității de sinteză a APAB (stafilococul auriu rezistent produce 3,3 mg APAB, față de 0,033 mg constatat la tulpina originală nerezistentă) ; 2) mărirea capacității de detoxifiere a sulfamidei ; 3) dezvoltarea și apariția de căi noi de sinteză în care nu mai este nevoie de metabolitul respectiv ; 4) scăderea permeabilității față de sulfamidă.

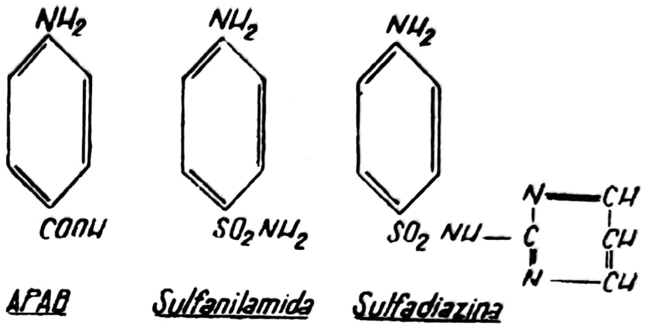

NH₂
NH₂
NH₂
COOH
SO₂NH₂
SO₂ NH—
N
CH
C
CH
N
CH
APAB
Sulfanilamida
Sulfadiazina

Fig. 42. — Formulele acidului para-aminobenzoic (APAB), sulfanilamidei și sulfadiazinei.

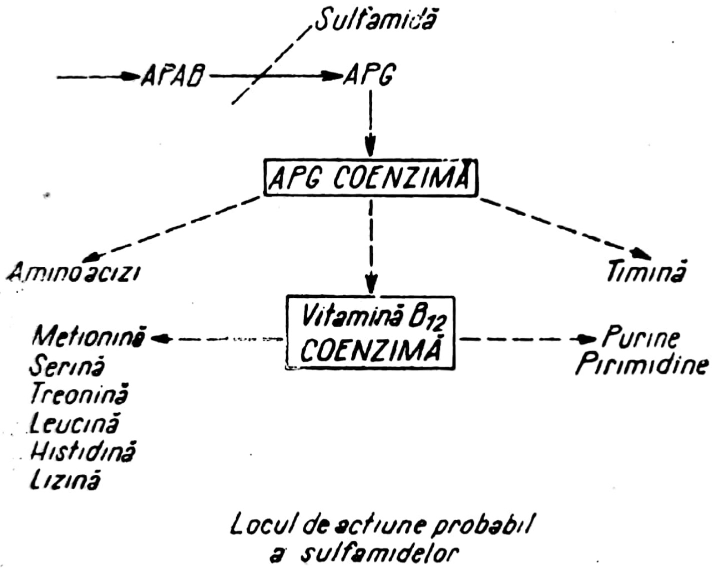

Sulfamidă
APAB
APG
APG COENZIMĂ
Aminoacizi
Timină
Vitamină B12 COENZIMĂ
Metionină
Serină
Treonină
Leucină
Histidină
Lizină
Purine
Pirimidine
Locul de acțiune probabil a sulfamidelor

Fig. 43. — Modul probabil de acțiune a sulfamidelor (Zinsser modificat).

În general dezvoltarea rezistenței bacteriei față de o substanță sulfamidică, implică cîștigarea rezistenței față de toate sulfamidele adevărate.

Acţiunea agenţilor biologici asupra bacteriilor

Prof. N. NESTORESCU

Relaţiile dintre microorganisme cu referinţe particulare asupra antagonismului microbian

Printre agenţii care acţionează puternic asupra bacteriilor, înafară de agenţii fizici şi chimici, se enumeră şi o serie de agenţi biologici, care au fost mai bine studiaţi în ultimile două decenii.

Printre aceşti agenţi biologici trebuie consideraţi :

1. Microorganismele înseşi, deoarece în natură sînt foarte rare ocaziile ca un germen microbian, singur, să fie spaţial izolat ; acest lucru se întîmplă numai cu ocazia invadării organismelor superioare (septicemii) ; în toate celelalte cazuri, germenii microbieni, găsindu-se sub forma reunirii mai multor specii, suferă influenţe variate şi reciproce din partea celorlalţi germeni cu care trăiesc în convieţuire.

2. Virusurile şi bacteriofagii, cele dintîi, potrivit părerii lui Zilber, putînd parazita bacteriile, ceea ce îngăduie persistenţa acestora în natură, fenomen denumit de către acest autor viroforie sau allobioforie, şi cei de pe urmă—bacteriofagii — care în anumite condiţii pot să determine la bacterii fenomenele de lizogenie sau de liză.

În cadrul fenomenelor biologice fundamentale ale germenilor microbieni care impun aspectele nişei ecologice în care aceştia trăiesc, pe lîngă fenomenele de variabilitate care vor fi descrise în altă parte (genetica microbiană), un rol important îl joacă fenomenul denumit *presiunea de selecţie.* Acest fenomen biologic acţionează după alte mecanisme decît cele cunoscute la fenomenul de variabilitate şi puterea sa, în cazul nostru, se exercită asupra oricărei populaţii microbiene, fie că ea este în cultură pură sau mixtă, fie că ea este prezentă *in vitro* sau *in vivo.*

Presiunea de selecţie este tendinţa pe care o au unii germeni dintr-o populaţie microbiană eterogenă de a se substitui altor germeni existenţi la un moment dat în nişa lor ecologică. Ea se datoreşte proprietăţilor particulare ale acestor germeni de a-şi crea acest avantaj cînd ei sînt plasaţi în condiţii convenabile lor. Presiunea de selecţie depinde de intensitatea şi numărul factorilor selectivi precum şi de toleranţa şi gradul de toleranţă la aceşti factori al germenilor microbieni. Substituirea unei populaţii vechi prin alta nouă este în raport direct cu puterea presiunii de selecţie.

Numeroase experienţe de laborator şi fapte de observaţie clinică şi epidemiologică (infecţii intraspitaliceşti) au arătat încă de pe acum că presiunea de selecţie se poate exercita atît asupra speciilor şi tulpinilor microbiene aparţinînd aceleiaşi specii, cît şi asupra indivizilor microbieni înşişi.

Din cele relatate mai sus, germenii microbieni, trăind în biocenoza lor naturală, sînt nevoiţi să-şi stabilească diferite relaţii care pot influenţa puternic nu numai procesul activ al metabolismului bacterian, în particular, şi al biocenozei, în general, ci şi procesul genetic.

Relaţiile dintre microorganisme, în mediul lor natural, pot fi de mai multe feluri :

a) *Relaţii de simbioză* sau sinergism, care desemnează convieţuirea împreună a două organisme, a căror viaţă nu ar putea fi dusă dacă fiecare din ele ar fi singure. Termenul de sinergism a căpătat însă, o dată cu extinderea chimioterapicelor, înţelesul pe care îl dau farmacologii şi anume, însumarea algebrică pozitivă a efectelor a doi agenţi capabili să producă, pînă la sfîrşit, acelaşi rezultat. Ar trebui reamintit că, în unele cazuri, acţiunea de combinare a două droguri este mai mare decît aceea care poate fi anticipată din suma acţiunii lor. În acest caz avem de-a face cu ceea ce se numeşte potenţare. În microbiologie, sinergismul şi potenţarea pot fi puse în evidenţă atît *in vitro*, cît şi *in vivo*.

In vitro, efectele sinergismului s-au dovedit dependente de concentraţia fiecărui agent în parte, de numărul şi speciile microbiene prezente în momentul intervenţiei substanţelor sinergice, de gradul de susceptibilitate al acestora, precum şi de condiţiile de mediu.

Pînă în prezent specia microbiană cea mai rezistentă la sinergismul chimioterapicelor rămîne *Pseudomonas pyocyanea.*

In vivo, sinergismul chimioterapicelor a fost pus în evidenţă în diferite feluri : Hall, lucrînd pe oul de găină embrionat, infectat experimental, a stabilit efectele sinergice ale streptomicinei şi sulfadiazinei faţă de germeni din grupul *Brucella*, iar Heilman, pe de altă parte, a constatat o reducere marcată a organismelor viabile în splina şoarecilor trataţi cu o combinaţie de clortetraciclină şi dihidrostreptomicină.

b) *Relaţii stimulatoare*, cunoscute sub numele de *hormesis*, care determină efecte stimulatoare de creştere pentru microorganisme, plante şi animale. Garrot a arătat că penicilina stimulează *Ps. pyocyanea*, iar Welsch, acelaşi lucru pentru *S. typhi*. Efectele stimulatoare ale antibioticelor sînt deseori incriminate drept cauză a apariţiei de *Candida albicans* sau înlocuirea florei gram-pozitivă prin floră gram-negativă în rino-faringele bolnavilor cărora li s-au administrat aceste substanţe pe durată prelungită.

Pe de altă parte, Moore şi colaboratorii au demonstrat că streptomicina adăugată la raţia alimentară a puilor de găină determină o creştere evidentă a acestor animale, iar Nickell a observat acelaşi fenomen la plante.

c) *Relaţii de indiferenţă* cînd doi sau mai mulţi germeni trăiesc în aceeaşi biocenoză, fără influenţă aparentă asupra metabolismului, creşterii, înmulţirii sau morţii lor.

d) *Relaţii de antagonism,* care în natură sînt foarte numeroase. Pentru a demonstra acest lucru, este suficient să se facă o suspensie în ser fiziologic a unei cantităţi mici de pămînt, care va fi însămînţată pe suprafaţa gelozei din mai multe cutii Petri şi ulterior incubate la 28 şi 37°. După un timp relativ scurt, se vor dezvolta colonii de germeni care vor prezenta zone de inhibiţie în jurul lor, ceea ce denotă împiedicarea creşterii altor specii microbiene.

Specia care creşte şi împiedică creşterea altei specii microbiene este denumită antagonistă, specia microbiană împiedicată să crească ia denumirea de specie concurentă.

Antagonismul unei specii se poate datori mai multor cauze, din care se pot enumera :

1. Vitalitatea mai mare pe care o are specia antagonistă faţă de specia concurentă, prima putînd să epuizeze substanţele nutritive necesare celei de-a doua. Exemplu : dacă se însămînţează în acelaşi mediu de cultură stafilococi şi gonococi, primii germeni utilizează întreaga hrană de care sînt lipsiţi ceilalţi, cultura finală fiind reprezentată numai prin stafilococi.
2. Modificarea mediului prin produsele de metabolism ale speciei antagoniste care creează condiţii defavorabile speciei concurente (spre pildă, prin fenomene de fermentaţie).
3. Elaborarea de către actinomicete, mucegaiuri şi bacterii a unor substanţe cu acţiune specifică, denumite substanţe antibiotice.

Antagonismul actinomicetelor este foarte frecvent. Descoperit de către Gasperini, în 1890, el a fost bine studiat de către cercetătorii sovietici Nahimovskaia, Krasilnikov şi Koreneako. În 1939 Nahimovskaia a arătat că 59% din tulpinile de actinomicete au acţiune antagonistă faţă de bacterii, în special faţă de cele gram-pozitive, iar Krasilnikov şi Koreneako au arătat că antagonismul cel mai puternic a fost pus în evidenţă la *Actinomyces violaceus* şi *Actinomyces aurantiacus.* Waksman şi colaboratorii (1942) pe de altă parte, au studiat răspîndirea în natură a actinomicetelor antagoniste, speciile cele mai frecvente fiind întîlnite în solul îngrăşat cu gunoi de grajd putrezit.

Fenomenul de antagonism este foarte răspîndit şi la mucegaiuri. Ciupercile inferioare — fungii imperfecţi — nu produc substanţe antibiotice, pe cînd 40% din mucegaiuri din specia *Aspergillus* şi 25% din specia *Penicillium* exercită o puternică acţiune antagonistă asupra bacteriilor. Cei mai mulţi antagonişti inhibează creşterea germenilor gram-pozitivi, însă unele tulpini sînt active şi asupra germenilor gram-negativi (Gauze). Sînt unele specii de ciuperci capabile să acţioneze antagonic şi asupra altor ciuperci. Solul de pădure oferă numeroase specii de ciuperci cu putere antagonistă faţă de bacterii.

Antagonismul bacterian, deşi puţin studiat, a fost pus în evidenţă mai ales la bacteriile sporulate. *B. anthracis, B. brevis, B. mycoides* printre bacteriile sporulate, *Ps. aeruginosa,* streptococii, stafilococii, *Esch. coli,* printre cele nesporulate etc. au dovedit activitate antagonică faţă de numeroase alte specii microbiene, ca : *S. typhi, C. diphtheriae, M. tuberculosis, P. pestis* etc.

Apariţia substanţelor antibiotice la germenii microbieni, ca mijloc de apărare sau agresiune, arată pînă la ce grad poate fi întins, în natură, fenomenul de adaptare, ele apărînd în procesul evolutiv ca rezultat al selecţiei naturale şi al luptei dintre specii.

Se ştie astăzi că fenomene de antagonism au fost întîlnite chiar printre substanţele antibiotice. Astfel, Jawets (1950), infectînd şoareci cu streptococi din grupul A, pe care îi trata cu diferite substanţe combinate, a observat că animalele care primeau concomitent penicilină şi cloromicetină mureau într-o proporţie mai mare decît atunci cînd erau tratate cu fiecare antibiotic separat.

Gîndirea oamenilor de ştiinţă privitor la folosirea fenomenului de antibioză în scopuri terapeutice datează de multă vreme; încă din 1857, Pasteur a observat că zeama de ceapă, fără să afecteze alte microorganisme, inhibează creşterea bacilului lactic. În 1885, V. Babeş, care avea în această problemă, cunoştinţe profunde pentru acea vreme scria, datorită geniului său imaginativ: „unii microbi elaborează substanţe chimice care pot inhiba creşterea altor organisme; dacă studiul antagonismului mutual al bacteriilor ar fi suficient de avansat, o boală cauzată de o bacterie ar putea probabil să fie tratată cu altă bacterie”.

În primul sfert al secolului al XX-lea, progresele în domeniul antibiozei cu scop terapeutic s-au oprit la recunoaşterea importanţei problemei, fără a se ajunge la rezultate obiective, concrete.

Abia în 1929, o dată cu descoperirea penicilinei de către A. Fleming şi folosirea de către acest savant a acestei substanţe, la început în metode de izolare a germenilor microbieni, iar apoi şi în scop terapeutic, precum şi concentrarea şi purificarea ei de către colectivul de la Oxford (Florey, Chain, Heatley etc.) în timpul celui de-al doilea război mondial, au început, cu adevărat, investigaţiile ştiinţifice asupra acestui fenomen.

Din 1941 încoace, cercetările asupra descoperirii substanţelor antibiotice noi, asupra modului lor de acţiune, ca şi asupra rolului important pe care acestea îl au în procesul infecţios, pînă la imprimarea unei patologii noi, care din ce în ce mai mult începe să se afirme, nu mai contenesc.

Munca de cercetare privitoare la obţinerea de antibiotice noi presupune un nivel foarte ridicat de competenţă, de care trebuie să dea dovadă colectivele de lucru angajate în această problemă.

Iată care ar fi procedeul tehnologic al descoperirii unui nou antibiotic: cercetarea de tulpini microbiene cu acţiune antibiotică; cercetarea şi izolarea de germeni-test pentru aceste antibiotice; determinarea *in vitro* a spectrului antibiotic; extracţia şi purificarea antibioticului; studiul farmacologic complet (experimental şi clinic); stabilirea constituţiei chimice şi, eventual, constituirea prin sinteză a moleculelor posedînd activitatea antibiotică.

Un studiu atît de complex imprimă foarte deseori eliminarea numeroaselor antibiotice obţinute. Abraham arăta, în 1959, că din 10 000 de specii de actinomicete din sol, aproape 2 500 produceau antibiotice, însă numai 10 erau noi şi din aceste 10 numai una avea valoare clinică. Iată de ce nu trebuie să ne mirăm că au fost examinate, pînă în prezent, mai multe sute de mii de tulpini aparţinînd mai multor specii microbiene, şi numai 40 — 50 de antibiotice sînt azi practic utilizate în clinică.

Metode de izolare şi de cercetare a proprietăţilor antagoniste ale microorganismelor

Izolarea diferitelor tulpini de microorganisme antagonice se poate face cu ajutorul a numeroase metode.

Una din metode este cea preconizată de către Schatz, Bugy şi Waksman, denumită metoda plăcilor de agar bacterian. Metoda constă în următoarele:

Se prepară o soluţie de geloză 2% în apă distilată, conţinînd 1% glucoză şi 0,2% Na_2HPO_4. Se toarnă în tuburi în cantitate de 10 ml şi se sterilizează 20 de minute la 120°.

Se prepară apoi în apă o suspensie de bacterii vii dintr-o anumită specie, spre pildă de *Esch. coli*, se centrifughează iar sedimentul se introduce în agarul topit la 42°, amestecîndu-se bine. „Agarul bacterian" astfel obţinut este turnat în cutii Petri, conţinînd fiecare cîte 1 ml de suspensie de sol în diferite concentraţii 1/100 — 1/1 000. Se amestecă bine. Se incubează la 28 sau 37°, timp de 3 — 10 zile. Se poate uşor constata existenţa antagoniştilor după zonele clare din jurul coloniilor, ca urmare a lizei suspensiei bacteriene din agar. Se izolează specia antagonistă din aria de liză şi se identifică.

Studiul proprietăţilor antagoniste ale microorganismelor izolate se poate face, fie pe medii lichide, fie pe medii solide.

Mediile lichide pot fi sintetice sau medii organice complexe.

Mediile sintetice conţin o sursă de azot, cum sînt nitraţii, în concentraţie 0,2 — 0,6%, săruri ca: K_2HPO_4 sau KH_2PO_4 în cantitate de 0,1 — 0,2%; $MgSO_4$ 0,05%; KCl (0,05%) şi $FeSO_4$ (0,001%) şi, în fine, glucoză 2 — 6%. Uneori este necesar să se mai adauge extract de drojdie, extract de carne etc.

Mediile organice complexe conţin azotul sub formă de peptonă, triptonă, iar ca sursă de carbon, melasă, amidon sau glucoză.

Mediile sînt însămînţate cu tulpina antagonică izolată şi se cultivă de obicei, în baloane care permit cultivarea în profunzime, cu supraaerare.

Din timp în timp se determină proprietăţile antibiotice ale lichidului de cultură, diluîndu-l cu apă distilată sterilă, în progresie aritmetică, fiecare diluţie fiind amestecată în cantităţi egale cu geloză lichefiată în tuburi, care ulterior se lasă să se întărească în plan înclinat.

Pe aceste tuburi se însămînţează o serie de germeni, ca stafilococul auriu, *B. subtilis*, *Esch. coli*, *B. mycoides* etc., lăsîndu-le la 37°, 24 de ore. După acest interval de timp se cercetează faţă de care specie microbiană şi la ce diluţie se manifestă acţiunea inhibitoare.

Metoda aceasta poate fi folosită cînd specia antagonistă este reprezentată prin fungi şi actinomicete; ea nu poate fi folosită pentru bacteriile sporulate. Pentru acestea din urmă se poate folosi metoda cu tuburi de geloză, care constă în următoarele:

Se prepară o serie de tuburi cu geloză moale 5‰, care conţin o suspensie de bacterii-test de o anumită specie.

Deasupra gelozei se toarnă lichidul de cultură de cercetat. În cazul în care acest lichid conţine o substanţă antibiotică, aceasta difuzează în grosimea gelozei, dînd naştere unei zone clare în porţiunea superioară a gelozei, unde creşterea bacteriilor-test este inhibată (Gauze).

Cercetarea proprietăţilor antagoniste ale microorganismelor pe medii solide se face folosind mai multe metode. Una dintre metodele recomandate de Gauze este următoarea:

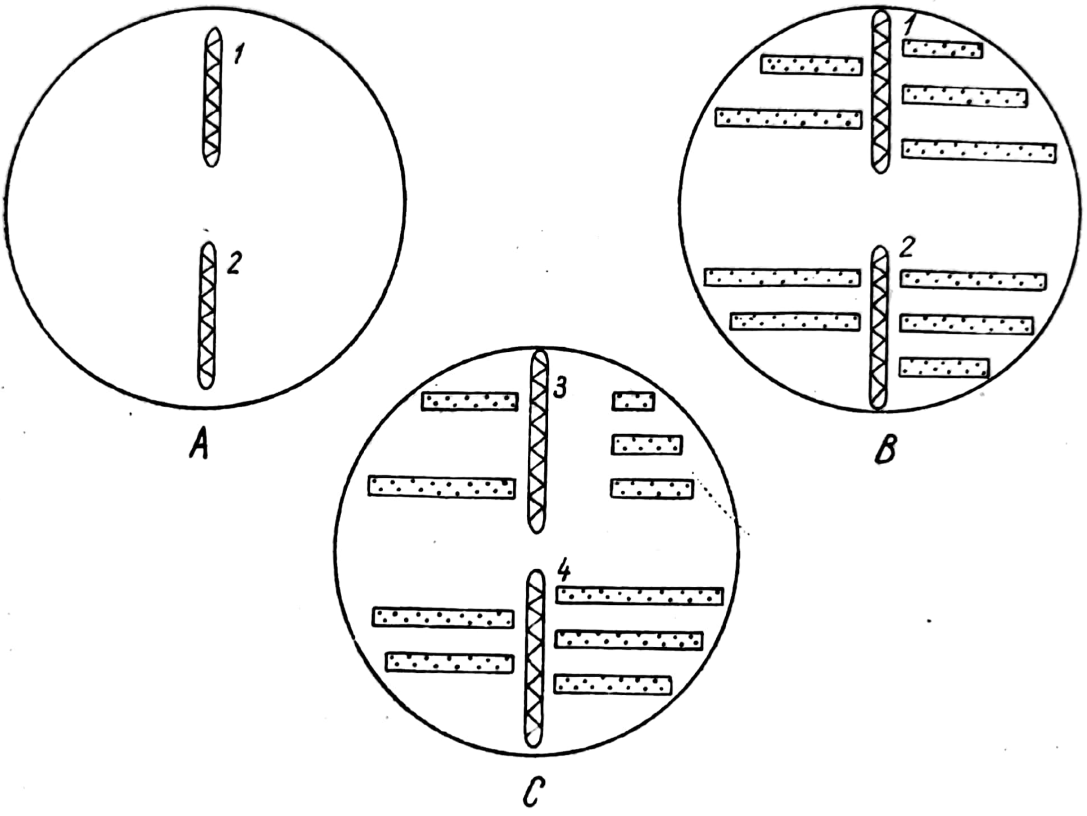


Fig. 44. — Metodă de determinare a proprietăţilor antagoniste ale actinomicetelor.
A – plăci Petri după 48 de ore de la însămînţarea a 2 tulpini de actinomicete (1,2); creşterea a 2 tulpini diferite în striuri.
B – însămînţarea suspensiilor de diferite bacterii de o parte şi de alta a speciilor 1 şi 2 de actinomicete (creşterea nu este inhibată).
C – însămînţarea suspensiilor din aceleaşi bacterii faţă de speciile 3 şi 4 de actinomicete (creşterea este inhibată numai de specia 3).

Mediul Hottinger, gelozat 2%, se toarnă în plăci Petri. Pe suprafaţa plăcilor se însămînţează diferite tulpini de actinomicete, ciuperci sau bacterii, în striuri (cîte două striuri pe fiecare placă în prelungirea unui diametru). Se incubează 48 de ore la 28°. În acest timp actinomicetele se dezvoltă, iar geloza din jurul coloniilor se impregnează cu eventualele substanţe antibiotice. Apoi, perpendicular pe striurile de actinomicete care au crescut deja, se fac alte striuri, de această dată cu diferiţi germeni, ca: stafilococi, *Esch. coli*, *Ps. pyocyanea*, *B. mycoides*, *Candida albicans*. Se incubează 24 de ore la 37°, după care se citesc rezultatele.

Dacă unul din actinomicete elaborează un antibiotic cu activitate pentru una din speciile microbiene însămînţate, în jurul acesteia se produce o inhibiţie a creşterii pe o distanţă de 1 – 2 cm.

Antibioticele

Prof. N. NESTORESCU

Cunoaşterea relaţiilor dintre microorganisme în biocenoza lor naturală, ca şi punerea la îndemînă a metodelor de lucru necesare pentru izolarea şi identificarea speciilor antagoniste au îngăduit oamenilor de ştiinţă să prepare şi să utilizeze, în condiţii convenabile, produsele antibiotice elaborate de actinomicete, ciuperci şi bacterii.

O definiţie atotcuprinzătoare a antibioticelor este încă greu de dat.

După Waksman, antibioticele sînt substanţe antimicrobiene produse de fiinţe superioare (plante şi animale) şi mai ales de microorganisme. Această definiţie, de sferă largă, a fost utilizată pînă în momentul cînd chimiştii au reconstituit formula penicilinei şi mai ales a cloromicetinei, substanţă pe care au obţinut-o pe cale sintetică.

Pentru aceste motive s-a dat altă definiţie antibioticelor. Tréfouël defineşte antibioticele ca „substanţe chimice de origine biologică sau sintetică, capabile de a distruge electiv unele microorganisme sau de a le împiedica multiplicarea, permiţînd astfel fiinţelor superioare de a lupta eficace contra bolilor infecţioase''.

Multe organisme antagoniste produc mai mult de o singură substanţă antibiotică ; pe de altă parte, un acelaşi antibiotic poate fi produs de mai multe specii de microorganisme.

La unele specii de microorganisme, facultatea de a elabora antibiotice este permanentă, chiar în absenţa speciei concurente ; la altele, antibioticele nu sînt elaborate decît în prezenţa concurentului. Reiese, prin urmare, că elaborarea antibioticelor de către microorganisme este rezultatul unui proces istoric evolutiv, ca urmare a influenţei mediului şi a fenomenului de adaptare continuă a microorganismelor în biocenoză.

Acţiunea antibioticelor este selectivă, însă spectrul de acţiune poate fi larg, relativ limitat sau îngust ; astfel tetracilina, aureomicina şi cloromicetina au spectru larg ; penicilina, eritromicina şi bacitracina spectru relativ limitat, iar polimixina şi nistatina au spectru îngust.

După cum au un spectru mai mult sau mai puţin larg, antibioticele afectează germeni gram-pozitivi, gram-negativi, sau acidorezistenţi.

Asupra virusurilor, şi în special a celor de dimensiuni mici, antibioticele nu au acţiune evidentă.

Pe de altă parte, acţiunea antibioticelor cunoaşte ca mecanism esenţial bacteriostaza; ele inhibează dezvoltarea germenilor sensibili, însă nu-i ucid; în anumite condiţii, unele antibiotice pot fi însă şi bactericide.

Clasificarea antibioticelor este greu de făcut pe baza actualelor cunoştinţe; ele au fost clasificate după spectrul de acţiune, după origine, după natura lor chimică, după capacitatea de a difuza în mediu, după nevoi industriale etc.

Pentru nevoile microbiologilor, clasificarea antibioticelor, bazată pe capacitatea de a fi eliberate în mediu sau nu, pare să fie cea mai utilă.

După această clasificare, antibioticele au fost împărţite în două mari grupe:

1. **Antibioticele intracelulare**, legate de corpul microbian, sînt puse în evidenţă numai după distrugerea germenilor producători cu ajutorul unui acid tare. După tratarea cu acid, suspensia microbiană se centrifughează, iar sedimentul este supus acţiunii alcoolului. În general, antibioticele intracelulare sînt formate din molecule mari de natură polipeptidică. Printre aceste antibiotice trebuie enumerate tirotricina, polimixinele, bacitracina etc.

a) Tirotricina a fost obţinută de Dubos, în 1939, ca fruct a foarte numeroase cercetări. El a izolat-o dintr-un germen din sol — B. *brevis*. Tirotricina posedă doi constituenţi: gramicidina şi tirocidina. Ambele componente sînt toxice, fie că sînt administrate parenteral, fie oral. Pe de altă parte, tirocidina este inactivată de sînge, ser, peptonă etc.

b) Polimixinele constituie un grup de antibiotice, denumite A.B. C.D.E., produse de variante ale *B. polymyxa*, germen întîlnit în sol şi aer.

Unele din ele sînt nefrotoxice; cea mai utilă clinicii este polimixina E., care este foarte activă şi netoxică. Sînt solubile şi stabile în soluţie apoasă.

c) Bacitracina este obţinută din *B. subtilis*. Şi acest antibiotic este nefrotoxic. Este hidrosolubilă.

Antibioticele intracelulare fiind toxice, mai ales pe cale parenterală, sînt administrate de obicei local, sub formă de infiltraţii, unguente, pulberi etc.

2. **Antibioticele extracelulare** nu sînt legate de corpul microbian, ca cele dintîi; ele difuzează uşor în mediul de cultură, pentru care motiv li s-au dat această denumire. Antibioticele extracelulare sînt cele mai numeroase şi cele mai importante din punct de vedere clinic.

Obţinerea antibioticelor extracelulare se face cultivînd microorganismele producătoare în medii de o anumită compoziţie, folosind deseori metoda culturilor în profunzime, supraaerate şi controlînd, în dinamica dezvoltării culturii, timpul cel mai potrivit cînd antibioticul este elaborat la maximum. Se centrifughează pentru a elimina germenii, iar supernatantul, care conţine substanţă activă, este tratat în vederea concentrării, purificării şi eventual cristalizării substanţei. Se titrează în raport cu un antibiotic etalon, fixîndu-i-se activitatea în unităţi internaţionale. Se controlează din punctul de vedere al toxicităţii, toleranţei şi eficienţei clinice.

După natura lor chimică, antibioticele extracelulare au fost împărţite în:

a) antibiotice de natură acidă, de exemplu: penicilinele, care formează săruri hidrosolubile cu cationi (Na^+, K^+, Ca^+), fie săruri puţin solubile cu baze organice (procaină etc.), fie esteri;

b) antibiotice de natură bazică; de exemplu: streptomicina, care este o bază terţiară, folosită mai ales sub formă de sulfat de streptomicină sau dihidrostreptomicină;

c) antibiotice de natură amfoteră, de exemplu: tetraciclinele, formate dintr-un schelet chimic, prevăzut cu patru nuclei ciclici benzenici, de unde le derivă şi numele. Pot fi utilizate, fie sub formă amfoteră, fie sub formă de săruri acide sau bazice;

d) antibiotice de natură inertă, de exemplu: cloromicetina, obţinută azi pe cale sintetică (cloramfenicolul), este un compus nitrobenzenic cu patru izomeri, cel levogir şi racemic fiind singurii activi.

Să redăm cîteva detalii asupra acestor antibiotice, necesare microbiologilor.

Antibioticele de natură acidă: penicilina, descoperită de A. Fleming, în 1929, deşi este sintetizată, calea de obţinere rămîne încă extractivă.

Este produsă de mai multe ciuperci, însă în particular de către *P. notatum* şi *P. crysogenum*. Se cunosc azi mai multe peniciline: G.F.X.K. O.V. Penicilinele sînt titrate în unităţi internaţionale de penicilină, o unitate fiind egală cu activitatea oferită de către 0,6 γ din benzilpenicilatul de sodiu, care constituie etalonul internaţional, propus şi păstrat la Institutul naţional de cercetări medicale din Londra.

Tulpina de germeni faţă de care se titrează este stafilococul Oxford.

Penicilinele sînt foarte solubile în solvenţi organici şi puţin solubile în apă, în timp ce sărurile lor sînt foarte solubile în apă şi practic insolubile în solvenţi organici. Instabile în soluţii acide sau alcaline, ele sînt inactivate de agenţi oxidanţi şi căldură. Stabilitate maximă la pH 6 — 8.

Penicilinele acţionează puternic asupra stafilococilor, streptococilor hemolitici, pneumococilor, grupului *Neisseria*, *B. anthracis*, *Cl. tetani*, clostridiilor gangrenei gazoase, treponemelor (*pallidum*, *leptospira* şi *recurentis*) şi mai slab asupra actinomicetelor şi virusurilor mari (trahom şi psittacoză). Nu acţionează asupra germenilor gram-negativi, micobacteriilor şi rickettsiilor.

Antibioticele de natură bazică. Waksman, căutînd un antibiotic care să acţioneze mai eficient asupra germenilor gram-negativi, s-a adresat grupului actinomicetelor. Cu ocazia acestor cercetări, Waksman a izolat o serie de substanţe antibiotice care s-au dovedit active, *in vitro*, însă mai puţin active *in vivo*, pe deasupra fiind şi toxice (actinomicina, clavacina, fumagacina, micromonosporina, streptotricina etc.).

În 1944, Schatz, Bugie şi Waksman au extras din unele tulpini de *Streptomyces griseus* o substanţă denumită streptomicină, mai puţin toxică, care acţionează puternic asupra germenilor gram-negativi. Prin hidrogenarea catalitică a streptomicinei s-a obţinut dihidrostreptomicina.

Streptomicina este foarte solubilă în apă şi mai rezistentă la variaţiile de pH decît penicilina. Activitatea streptomicinei se exprimă gravimetric, o unitate de streptomicină fiind egală cu 1/1 000 000 dintr-un gram (1 miligram de streptomicină = 1000 u., 1 mg de sulfat de streptomicină = 800 u., 1 mg de clorhidrat de streptomicină = 834 u).

Tulpina folosită pentru titrarea streptomicinei este *Klebsiella pneumoniae*.

Streptomicina acţionează foarte activ faţă de *B. tularense*, *P. pestis*, *Br. abortus*, *H. influenzae*, *M. tuberculosis*, unele enterobacteriacee (*Esch. coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus*) şi mai slab faţă de germeni grampozitivi (stafilococi, streptococi hemolitici, enterococi).

Antibioticele de natură amfoteră. Tetraciclinele, pe lîngă înrudirea formulei lor chimice, sînt foarte asemănătoare, atît prin proprietăţile lor fizico-chimice, cît şi prin spectrul lor de activitate.

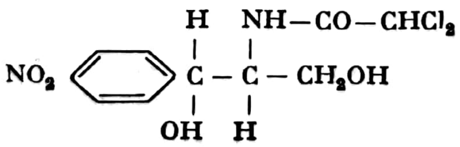
a) Aureomicina, descoperită în 1948 de către Duggar, a fost extrasă dintr-un actinomicet denumit *Streptomyces aureofaciens*, de unde i se trage şi numele. Solubilitatea sa în apă depinde de reacţia mediului : solubilă în mediu slab acid, precipită uşor în mediu alcalin, mai ales în prezenţa ionilor de calciu. Este solubilă şi dincolo de pH 8,5, însă îşi pierde repede activitatea.

b) Teramicina a fost extrasă pentru prima oară de către Finlay, în 1950, dintr-un alt actinomicet, denumit *Streptomyces rimosus*. Antibioticul este foarte stabil şi foarte solubil în apă sub formă clorhidrică. Prezintă o toxicitate slabă.

c) Hostaciclina este extrasă din actinomicetul *Streptomyces texasi*. Din punct de vedere chimic, acest antibiotic este aureomicina dehalogenată. Este solubilă în apă, unde formează soluţii stabile. Este termostabilă (încălzită la 100°, îşi păstrează o mare parte din activitate).

Tetraciclinele posedă un spectru de acţiune foarte larg ; diferenţele de spectru dintre aceste trei antibiotice sînt mici ; aureomicina pare mai activă faţă de germenii gram-pozitivi ; teramicina acţionează mai activ faţă de germenii din grupul *Proteus*, iar hostaciclina faţă de germenii gram-negativi, în general. Pe lîngă aceşti germeni, tetraciclinele mai acţionează asupra spirochetelor, inclusiv genul *Leptospira*, asupra rickettsiilor, actinomicetelor, protozoarelor (tricomonas) şi chiar a unor viermi intestinali (oxiuri).

Antibioticele de natură inertă. În 1947, Burkholder şi Gottlieb au izolat un *Streptomyces* numit *Str. venezuelae*, din care au extras un antibiotic pe care l-au botezat cloromicetină. Antibioticul este un compus chimic neutru, care conţine azot. El a fost sintetizat, primind denumirea de cloramfenicol, formula antibioticului fiind următoarea :



Are o toxicitate relativ slabă.

Cloromicetina este puţin solubilă în apă, esterii săi sînt hidrosolubili. Spectrul de acţiune este tot aşa de larg ca al tetraciclinelor ; faţă de *S. typhi* — agentul febrei tifoide — pare cu totul specific.

Mecanismele de acţiune a antibioticelor. Acţiunea antibioticelor asupra celulei bacteriene, deşi este insuficient cunoscută, este explicată prin mai multe mecanisme, cele mai numeroase fiind legate de metabolismul bacterian şi de fiziologia celulei bacteriene în general. Pe măsura cunoaşterii verigilor metabolismului intermediar al bacteriilor, ca şi a funcţiilor membranei, protoplasmei şi cromozomului bacterian, pe de o parte, ca şi punctele nodale de interferenţă cu antibioticele, pe de alta, pe aceeaşi măsură înţelegem mai bine mecanismele de acţiune a antibioticelor şi a fenomenelor corelate cu acestea.

Dacă s-ar încerca o sinteză a opiniilor diferiţilor cercetători asupra mecanismelor generale de acţiune a antibioticelor, expuse cu ocazia numeroaselor reuniuni ştiinţifice internaţionale ţinute asupra acestei probleme, s-ar putea spune următoarele:

1. Antibioticele interferează cu diviziunea celulară, ducînd la oprirea multiplicării bacteriene, prin împiedicarea sintezei nucleoproteidelor.

2. Inhibînd multiplicarea celulară, antibioticele provoacă o producere şi o acumulare de produse toxice pentru bacterii care duc la moartea lor.

3. Antibioticele se pot substitui unui metabolit esenţial al proceselor vitale bacteriene.

4. Intrînd în competiţie cu o enzimă indispensabilă procesului metabolic al bacteriei sau blocînd unul sau mai multe sisteme enzimatice oxidoreductoare sau sisteme de altă natură, antibioticele dezvăluie alte mecanisme de acţiune.

5. Antibioticele pot face parte dintr-un sistem enzimatic şi produc în mediu peroxizi toxici pentru celula bacteriană.

6. În alte cazuri, antibioticele lucrează prin micşorarea tensiunii superficiale, putînd modifica permeabilitatea selectivă a membranei celulei bacteriene, distrugînd bariera ei osmotică.

Modul de acţiune a antibioticelor variază cu antibioticul considerat şi specia sau tulpina microbiană asupra căreia acţionează. În ultima vreme, numeroase cercetări au fost efectuate în privinţa mecanismelor de acţiune a penicilinei, streptomicinei, cloromicetinei etc.

Mecanismul de acţiune a penicilinei este legat de capacitatea de absorbţie şi concentrare în protoplasmă a acizilor aminaţi. Se ştie că, în opoziţie cu majoritatea bacteriilor gram-negative, bacteriile gram-pozitive au nevoie de aminoacizi preformaţi, deoarece ele nu au capacitate de sinteză pentru aceste substanţe. Acizii aminaţi preformaţi sînt concentraţi în protoplasmă, înainte de a fi utilizaţi în metabolism pentru sinteza proteinei, capacitate de concentrare pe care germenii gram-negativi nu o posedă.

Acţiunea antibiotică a penicilinei este legată mai ales de capacitatea de a împiedica pătrunderea aminoacizilor în celulă; ea nu afectează capacitatea de concentrare a lor; însă, rezervele din celulă scăzînd treptat, sinteza proteinelor este pînă la urmă inhibată.

Pe de altă parte, penicilina mai cunoaşte şi alte mecanisme: astfel, inhibează specific sinteza peretelui celular, care se face pe seama uridinnucleotidelor ce se acumulează în bacterie; inhibează sinteza proteinelor şi a acizilor nucleici, în opoziţie cu cloromicetina şi aureomicina, care împiedică numai sinteza proteinelor, dar nu şi pe a acizilor nucleici.

Datorită acestor mecanisme, penicilina ucide mai ales bacteriile în stare de diviziune și nu pe cele ce sînt în faza staționară, condițiile care scad ritmul de creștere a bacteriilor diminuînd activitatea penicilinei (Levaditi).

Mecanismul de acțiune a streptomicinei este mai puțin cunoscut. Se știe, în general, că streptomicina inhibează respirația bacteriilor, mai ales cele care sînt în faza de latență și că acțiunea ei se exercită într-o anumită etapă a metabolismului glucidic aerob, în special în condensarea acidului piruvic și acetooxalic (Umbreit).

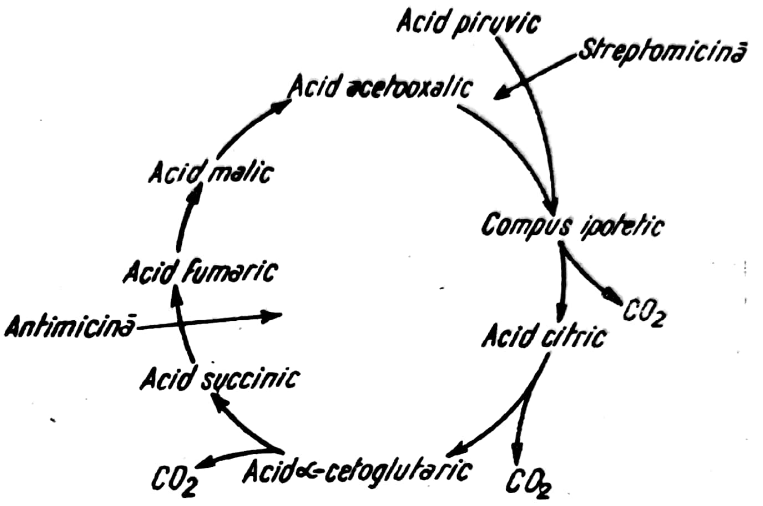


Fig. 45. — **Mecanismul de acțiune a streptomicinei și antimicinei (Gauze).**

Reflectat în „ciclul citric Krebs", streptomicina ar acționa la locul arătat în schemă (fig. 45).

Observații similare pentru *M. tuberculosis* au fost făcute la noi în țară de către Nasta, Păunescu și Georgescu.

Această reacție, care are loc la bacterii, nu poate avea loc în țesuturile umane și animale, deoarece enzimele interesate în reacție sînt localizate în mitocondrii, care posedă o pătură protectoare contra streptomicinei.

După Model și Sceglova, streptomicina diminuează capacitatea de hidroliză enzimatică a glicerinei, tulbură conținutul procentual între lipide, polizaharide și proteide și diminuează procesul de sinteză a nucleoproteinelor.

După alți autori, streptomicina ar interfera cu un metabolit esențial sau cu un component esențial al unei enzime de importanță vitală (Miller și Bohnhoff, 1947; Georgescu, 1957).

Mecanismul de acțiune a tetraciclinelor este puțin cunoscut. După cercetările lui Hahn și Wissman, aceste antibiotice înrudite intervin în sistemul de fosforilare la bacterii sau inhibează la rickettsii, spre exemplu, oxidarea acidului glutamic și acidului aspartic.

Mecanismul de acțiune a cloromicetinei este încă mai puțin cunoscut. Se știe sigur numai că acționează asupra sintezei proteinelor și nu a acizilor nucleici, ceea ce permite să ne pună la îndemînă o metodă selectivă în studiul diferențial al sintezei acizilor nucleici și a proteinei. Sinteza proteinelor este împiedicată, fie prin incapacitatea celulelor bacteriene sensibile de a folosi amoniu sau prin intervenția în combinarea glutamaților, fie prin intrarea în competiție a cloromicetinei cu anumiți acizi aminați, indispensabili sintezei. Asupra *S. typhi*, față de care cloromicetina s-a arătat atît de specific activă, se pare că interferează cu utilizarea triptofanului (Bordet). Pe de altă parte, cloromicetina se pare că tulbură metabolismul lipoizilor din bacterii, prin inhibarea acțiunii esterazelor.

Polipeptidele bazice, cum sînt tirotricina, subtilina și polimixina, acționează citolitic, distrugînd proprietatea osmotică a celulei bacteriene, pe cînd gramicidina împiedică absorbția fosforului mineral de către germenii microbieni (Duban).

Rezistența germenilor microbieni la antibiotice

Istoric. Fenomenul rezistenței germenilor la unii agenți medicamentoși a fost cunoscut cu mult înaintea utilizării clinice a antibioticelor.

Încă din 1887, Kosiakov arătase că *B. anthracis*, supus acțiunii unor soluții de concentrații crescînde de acid boric și sublimat, capătă proprietatea de a se adapta la concentrații de antiseptic, care inițial inhibau creșterea germenilor.

În 1907 Franke și Roehl au observat că *Trypanosoma brucei* poate deveni rezistentă prin expunerea la p-rosanilină, colorat cu acțiunea tripanocidală, descoperit de Ehrlich. Același fenomen de rezistență a fost constatat apoi, rînd pe rînd, atît *in vitro*, cît și *in vivo*, pentru numeroase substanțe medicamentoase (arsen, urotropină etc.).

Descoperirea, în 1935, a sulfonamidelor de către Domagk și utilizarea lor largă în clinici, au arătat, în mod neîndoios, că, o serie de specii microbiene, la început sensibile la aceste droguri, au devenit rezistente; gonococii și germenii din grupul *Shigella*, spre exemplu, care se arătau inițial foarte sensibili, deveneau rezistenți, procentul de tulpini rezistente crescînd pe măsură ce aceste medicamente erau mai mult utilizate.

Încă de la descoperirea și folosirea penicilinei și streptomicinei mai întîi, și apoi la toate celelalte antibiotice utilizate, s-a constatat o creștere procentuală a rezistenței germenilor patogeni; spre exemplu, stafilococii care, în 1948, erau sensibili la penicilină într-o proporție de 86%, nu mai erau sensibili la acest antibiotic, în 1954, decît în proporție de 28%. Același lucru s-a semnalat și pentru cloromicetină: de unde stafilococii, în 1948, erau sensibili 90%, în 1954 erau sensibili numai 83%. Și exemplele pot fi încă foarte numeroase.

Din cele de mai sus reiese că rezistența germenilor microbieni la chimioterapice în general, nu este decît un aspect particular al unei legi biologice generale, la care se supune materia vie în procesul ei continuu de dezvoltare și adaptare la factorii nocivi ai mediului extern.

Definiție. Este necesar ca noțiunea de rezistență a germenilor microbieni la chimioterapice să fie precizată: rezistența sau toleranța la antibiotice este o proprietate relativă; o tulpină de germeni poate să reziste la o anumită concentrație dintr-un anumit antibiotic, dar să fie sensibilă la o concentrație mai mare. Prin urmare, nu ar exista rezistență la antibiotice, ci mai degrabă grade de rezistență.

Sînt rare cazurile cînd, bunăoară, o tulpină de stafilococ care este rezistent la 20 γ/ml de streptomicină, rămîne rezistent și la doze cu mult superioare; în general, mai toate speciile microbiene se conformă regulii generale enunțate mai sus.

Pe de altă parte, cînd se vorbește de gradul de rezistență a unei tulpini microbiene, aparținînd unei anumite specii, spunînd că este sensibilă sau rezistentă, trebuie ținut seama că populația microbiană obținută, fie dintr-un individ bacterian, fie dintr-o colonie, fie, în fine, dintr-o cultură, nu este omogenă, indivizii microbieni care compun această populație putînd să prezinte grade diferite de sensibilitate sau rezistență. În practică se consideră că o anumită tulpină microbiană este sensibilă sau rezistentă la antibiotice, după cum acest atribut este manifestat „global'' de către această tulpină (Linz).

Clasificare. Rezistența germenilor microbieni la antibiotice poate fi de două feluri:

1. Rezistența naturală, care se constată în cazul tulpinilor aparținînd unor specii insensibile la antibiotice la dozele folosite în mod obișnuit. Ea este permanentă și poate fi datorită unor factori care fac inactiv antibioticul cu care aceste specii au venit în contact (în cazul penicilinei, prezența unei enzime denumită penicilinază; în alte cazuri, modificări metabolice care interferează cu antibioticul sau anumite particularități de funcționalitate a membranei celulare etc.).

2. Rezistența dobîndită sau indusă, care se constată în cazul tulpinilor inițial sensibile, dar devenite insensibile în urma unui contact, de scurtă sau lungă durată, cu antibiotice.

Rezistența dobîndită este în general specifică, adică se poate dobîndi rezistența la unul din seria de agenți chimioterapici, cum sînt penicilinele, cloramfenicolul, streptomicina, fără schimbarea comportării germenilor față de alți agenți; alți cercetători însă au întîlnit uneori și cazuri de rezistență încrucișată (Fusillo). Ea pare să nu fie permanentă și uneori este reversibilă: tulpinile devenite rezistente la antibiotice pot să-și recapete în anumite condiții sensibilitatea la antibiotice.

În mod obișnuit, se înțelege că o tulpină este rezistentă numai cînd rezistența ei este dobîndită.

Mecanismele rezistenței germenilor microbieni la antibiotice

Cunoștințele recente din domeniul geneticii microorganismelor au arătat că fenomenul de rezistență la antibiotice a germenilor microbieni este legat de aparatul genetic al celulei bacteriene. Ea este consecutivă unor modificări care apar la nivelul nucleotidelor din molecula de ADN, fapt demonstrat experimental, modificările fiind transmisibile în generații succesive. Printre mecanismele genetice care pot determina rezistența germenilor la antibiotice pot fi amintite:

1. *Mutațiile.* Mutațiile sînt consecința „erorilor'' replicării ADN care, după cum se știe, este purtător al informației genetice. Mutantul și mai ales clona care constituie descendența sa se va dezvolta în dauna indivizilor microbieni sensibili la antibiotice, care vor fi înlăturați în baza unui proces de selecție, cultura finală devenind antibioticorezistentă.

Mutațiile pot fi obținute cu ajutorul diferiților factori inductori fizici (radiațiile), chimici (substanțe mutagene) și biologici, printre aceștia putînd fi și antibioticele. Aceasta arată că un mutant antibioticorezistent poate apare și în afara contactului germenilor microbieni cu antibioticele.

2. Un fenomen legat de instalarea rezistenţei germenilor microbieni la antibiotice este fenomenul de *transmisie infectivă* descris în anii 1959—1962 de către autorii japonezi Mitsuhashi, Watanabe, Kondo etc. Aceşti autori, punînd în contact celule bacteriene sensibile cu celule bacteriene rezistente la antibiotice, provenite de la aceeaşi specie, au obţinut instalarea rezistenţei celor dintîi din simplul contact al acestor două feluri de celule. După aceşti autori, transmisia infectivă se obţine de la „celulă la celulă". Cu această ocazie autorii japonezi au folosit şi o terminologie adecvată. Se numeşte tulpină donatoare de rezistenţă, tulpina sau celula bacteriană care în cultura mixtă este rezistentă la chimioterapice şi se numeşte tulpină receptoare, respectiv celulă receptoare de rezistenţă, tulpina care primeşte rezistenţa celor dintîi. Pe de altă parte, factorul de transmisie infectivă de rezistenţă de la „celulă la celulă" a fost denumit factorul „R" (Kondo), iar unitatea genetică implicată în acest fenomen şi care poartă „markerul de rezistenţă" a fost numit factor de transfer de rezistenţă. După unii autori, factorul „R" pare să nu aibă legătură nici cu ADN sau ARN şi nici cu proteinele celulare, fiindcă enzimele respective — dezoxiribonucleaza, ribonucleaza şi proteinazele — în opoziţie cu ceea ce se petrece cu acizii nucleici sau proteinele celulare — nu acţionează asupra factorului „R" de transmisie infectivă. Acest factor este însă puternic influenţat de acriflavină (Kemeda), agitarea mecanică (Watanabe) etc. Factorul „R", nesupunîndu-se totdeauna fenomenului segregării, nu pare să fie legat obligatoriu de cromozomul bacterian, el reproducîndu-se independent de replicarea acestuia; această constatare îngăduie să se creadă că este o particulă genetică citoplasmică din categoria „episomelor" lui Jacob şi Wollman (Kondo şi colab.), care se multiplică cu o frecvenţă mai mare decît cromozomii.

3. *Transformarea* este un alt mecanism genetic care determină rezistenţă la antibiotice. Lucrările lui Hotchkiss, Alexander şi Leydi (1951), ale lui Ephrussi-Taylor şi ale altora, au demonstrat că rezistenţa la antibiotice se poate obţine şi cu ajutorul unui agent de transformare (AT) care nu este altul decît ADN. Izolînd ADN din pneumococi rezistenţi la penicilină şi streptomicină, Hotchkiss a reuşit să transfere rezistenţa la antibiotice la pneumococii sensibili, transformîndu-i în pneumococi rezistenţi. Rezistenţa la antibiotice prin procedeul transformării a fost obţinută şi la alte specii microbiene: *Haemophillus*, *Neisseria* etc.

4. *Transducţia*, fenomen descoperit de Zinder şi Lederberg în 1952, constă în transmiterea caracterelor de la o cultură bacteriană la alta cu ajutorul bacteriofagilor temperaţi. Fenomenul de transducţie se reduce în esenţă, tot la inocularea ADN în celula bacteriană. Bacteriofagii temperaţi reuşesc să obţină transmiterea rezistenţei cu ajutorul unor particule transductoare, care sînt ori fragmente din cromozomul bacterian în care s-au format, ori sînt replici ale unei regiuni cromozomice a acestei bacterii, care a înlocuit o regiune a cromozomului fagic. Introducîndu-se particulele transductoare într-o nouă bacterie primitoare, se introduce şi materialul genetic pe care îl poartă. În felul acesta, substratul material al rezistenţei la antibiotice a germenilor microbieni se incorporează în celulele sensibile la antibiotice.

În cazul transmisiei prin fagi, factorul „R” pare să se supună fenomenului de segregare, ceea ce arată că de această dată antrenarea factorului „R” la fenomenele specifice cromozomilor bacterieni este posibilă.

5. *Recombinarea*, ca efect al conjugării bacteriene, poate de asemenea constitui un mecanism pentru apariţia rezistenţei la antibiotice a germenilor microbieni. Ca urmare a fenomenelor genetice de „crossing over” şi segregare, se întîlnesc, după diviziune, organisme care posedă caracteristici moştenite de la fiecare din cei doi părinţi (recombinanţi), care au devenit rezistente la antibiotice.

6. *Enzime*. Datorită mecanismelor de acţiune a enzimelor, care indiferent din ce categorie fac parte (consecutive sau adaptative), sînt totdeauna controlate genetic, enzimele joacă un rol deosebit în procesul de rezistenţă a germenilor microbieni. Fie că este vorba de o enzimă constitutivă, fie că este vorba de o enzimă adaptativă — enzima indusă — enzimele s-au dovedit factori mai frecvenţi şi mai hotărîtori pentru creşterea rezistenţei germenilor microbieni la antibiotice în natură decît alţi factori genetici, ale căror mecanisme au fost descrise mai sus. De pildă, penicilinazele, dintre care unele sînt elaborate cu titrul constitutiv, iar altele cu titrul indus, se dovedesc factori deosebit de puternici de rezistenţă la antibiotice.

Am arătat la început că rezistenţa germenilor la antibiotice poate să se manifeste prin grade diferite de rezistenţă. Aceste grade de rezistenţă sînt datorite de asemenea unui fenomen genetic. În unele cazuri, antibioticele determină mutaţii unice, pe cînd altele determină o serie succesivă de mutaţii distincte ale căror efecte sînt aditive. În multe cazuri, o mutaţie unică nu determină decît o creştere uşoară de rezistenţă; trebuie multiple subtreceri pentru ca să se obţină mutanţi multipli cu un grad înalt de rezistenţă. Această instalare în trepte a rezistenţei la antibiotice se constată la penicilină, pentru care motiv, o asemenea rezistenţă este denumită, tip penicilină, instalarea în trepte a rezistenţei la penicilină implică mutaţii în locuri distincte fiecare transformîndu-se independent (Hotchkiss, 1951). În alte cazuri, ca o consecinţă a contactului cu antibiotice, o singură mutaţie este suficientă să determine, deodată, un grad ridicat de rezistenţă. Instalarea rezistenţei la antibiotice într-o singură treaptă se constată la streptomicină, pentru care motiv, o asemenea rezistenţă este denumită, tip streptomicină (Hotchkiss, 1952).

Toate mecanismele genetice arătate mai sus, supuse pe de altă parte şi la presiunea de selecţie, au o puternică tendinţă de a determina, pînă la sfîrşit, o selecţie a germenilor rezistenţi la antibiotice. Astăzi se susţine că aproape în exclusivitate, mutaţiile şi selecţia rămîn mecanismele biologice responsabile ale rezistenţei la antibiotice a germenilor microbieni.

Cunoştinţele referitoare la mecanismul instalării rezistenţei germenilor la antibiotice, ca şi mecanismele de înlăturare ale acesteia, au pus ipoteze noi de lucru în vederea luptei ce trebuie dusă contra rezistenţei germenilor la antibiotice. Printre acestea ar trebui reamintite acelea care sînt îndreptate pentru utilizarea ştiinţifică a antibioticelor în practică, precum şi studiul substanţelor antimutagenice necesare împiedicării procesului de mutageneză.

Unele particularităţi ale germenilor deveniţi rezistenţi la antibiotice

Germenii microbieni, deveniţi rezistenţi la antibiotice, dobîndesc mai totdeauna proprietăţi noi. Datorită modificărilor profunde care apar în metabolismul lor, pe care trebuie să-l desfăşoare pe alte căi decît celulele sensibile, germenii microbieni, în funcţie de specie, tulpină şi individ bacterian, pot prezenta schimbări variate, începînd cu aspecte particulare morfologice, care pot fi întinse pînă la aspecte particulare de patogenitate.

Astfel, la acţiunea penicilinei, cu toate că modificările morfologice nu sînt obligatorii, se constată uneori schimbări în dezvoltarea şi alungirea specifică a germenilor de formă cocoidă (Blair). Uneori această modificare este corelată cu apariţia de colonii pitice, germenii microbieni care le formează prezentînd o pigmentaţie şi o capacitate de hemoliză scăzută. Şi la streptomicină s-au observat colonii pitice.

Streptococul hemolitic — în special grupul C — dezvoltă colonii *glossy* sub acţiunea streptomicinei, în afară de un pleomorfism foarte accentuat, pe care îl împrumută *B.subtilis* şi *Pseudomonas aeruginosa.*

Sub acţiunea acestui antibiotic, Ciucă şi colaboratorii au obţinut la *Esch. coli*, sub acţiunea streptomicinei o variantă mucogenă, conţinînd o cantitate mare de hidrocarbonate.

Alţi autori au observat la germenii rezistenţi variaţii tinctoriale. Aşa bunăoară, Rake şi Klimek au obţinut stafilococi gram-negativi, iar Benda şi Urquia au arătat că formele sensibile de *M. tuberculosis*, cînd sînt tratate după o metodă combinată de coloraţie (metoda Ziehl-Neelsen şi metoda Gram), apar roşu strălucitor, cu multe granulaţii, pe cînd formele rezistente sînt omogene şi de culoare brun întunecat.

În afară de modificările morfologice şi tinctoriale, se constată numeroase modificări ale funcţiilor biologice sub acţiunea antibioticelor.

Observaţia că unele medii de cultură sînt mai susceptibile de a permite instalarea rezistenţei germenilor decît altele a arătat că antibioticele sînt capabile să intervină în metabolismul bacterian. Încă din 1952, Sevag şi Rosanoff au observat că rezistenţa *Esch. coli* şi a stafilococilor erau dependente de constituenţi definiţi ai mediilor de cultură. Pe de altă parte, aceiaşi autori au arătat că prezenţa serinei şi a leucinei, sau a leucinei şi metioninei într-un mediu de cultură glucozat şi sărat, prevenea instalarea rezistenţei la polimixină a tulpinii de *A. aerogenes.*

Schimbări în fermentarea hidrocarbonatelor au fost semnalate mai rar; se semnalează mai des întîrzieri de fermentaţie. Se pare că unii germeni rezistenţi au o capacitate mai mare de a sintetiza vitamine şi aminoacizi decît germenii sensibili, de origine. Pe de altă parte, rezistenţa interferează deseori cu schimbări de enzime; astfel, ea poate să reducă sau să înlăture activitatea unor dehidrogenaze sau, din contră, să le mărească activitatea. Mesrobeanu şi Mitrică au observat o scădere a activităţii dehidrazice a tulpinilor penicilinorezistente, care după părerea autorilor, şi-au schimbat şi caracterul pigmentogen. Proprietatea de a produce unele peroxidaze a fost semnalată la unele specii, în prezenţa anumitor antibiotice; în alte cazuri, tulpina microbiană din catalazo-pozitivă a devenit catalazo-negativă.

Rezistența la antibiotice poate duce la schimbarea tipului de hemoliză la streptococi, sau să scadă capacitatea de elaborare de coagulază la stafilococi.

Sensibilitatea la bacteriofag rămîne în general neschimbată (Nestorescu, Popovici, Alexenco). Unele schimbări au fost semnalate la stafilococii din grupul al III-lea, care par să posede un grad mai înalt de adaptabilitate pentru rezistență sau dependență.

Modificări serologice observate la germenii deveniți rezistenți la antibiotice au fost puțin semnalate. Rolan și colaboratorii au notat o scădere parțială a aglutinabilității ,,H'' la tulpinile de *Salmonella*, scădere care merge paralel cu gradul de rezistență. Ciucă și colaboratorii au constatat, la stafilococii penicilinorezistenți, o modificare a naturii substanțelor reducătoare a polizaharidelor, ca și o altă modalitate de dispoziție a acestor componente în molecula polimerului respectiv. Pe de altă parte, Ciucă, Mesrobeanu și Păunescu arată că deși există — cel puțin la stafilococ—antigene comune între tulpina rezistentă și cea sensibilă, în anumite condiții pot apărea restructurări antigenice, puse în evidență prin metoda Castellani.

Cercetările privind relațiile dintre virulența și rezistența la antibiotice sînt destul de numeroase. În mai toate cazurile virulența germenilor, deveniți rezistenți, scade. Se constată totuși diferențe în raport cu antibioticul folosit; pe cînd la o tulpină, devenită rezistentă la penicilină, virulența scade, aceasta se menține nemodificată în cazul rezistenței la streptomicină. Scăderea virulenței a fost observată la stafilococi, streptococi, meningococi, *Bact. tularense*, *P. pestis* etc.

Cît privește *M. tuberculosis*, se știe că virulența rămîne neschimbată sub acțiunea streptomicinei, însă scade considerabil sub acțiunea hidrazidei (Nasta și colaboratorii).

Corelația rezistenței la antibiotice a germenilor microbieni obținută *in vitro* și *in vivo*. Se poate admite, în general, că germenii care sînt sensibili *in vitro* sînt sensibili și *in vivo*. Dar, uneori, corelația aceasta nu este prezentă. Lipsa corelației este legată de mai mulți factori, care țin, pe de o parte, de condițiile de efectuare a antibiogramei, iar pe de alta, de condițiile fizico-chimice existente în regiunea infectată, care pot fi defavorabile acțiunii antibioticului folosit sau a incapacității lui de a veni în focar, în concentrații suficiente.

In vitro, acțiunea antibioticului variază în funcție de numărul germenilor puși în prezență, de natura mediului, pH, compoziție chimică etc., de cantitatea exactă și solventul antibioticului, de metoda de lucru folosită etc.

In vivo acțiunea antibioticelor este în majoritatea cazurilor întărită prin adăugarea altor mijloace de apărare a organismelor infectate, printre care cele mai importante sînt fagocitoza și anticorpii specifici, motiv pentru care uneori antibiotice socotite, după antibiogramă, inutile în terapie, s-au dovedit totuși eficace.

Alteori însă, antibiograma efectuîndu-se pe descendenții depărtați ai germenilor cauzatori de boală, ca și pe o colonie izolată dintr-o populație microbiană heterogenă sau mixtă (infecții polimicrobiene), se poate obține o lipsă de corelație care îndepărtează mult indicațiile de tratament cu antibioticul util.

Dependenţa bacteriilor de antibiotice. În 1947, Miller şi Bohnhoff au observat un caz particular de rezistenţă a meningococilor la antibiotice, caracterizat prin creşterea acestor germeni numai pe medii care conţineau antibiotic. Fenomenul a fost observat şi *in vivo*; Lenert şi Hobby, folosind infecţia intracerebrală la şoarece cu *M. tuberculosis*, au obţinut culturi pozitive din organele animalelor moarte, numai pe medii cu streptomicină.

Fenomenul de dependenţă la antibiotice, în afară de fungi, este observat numai la bacterii; gradul de dependenţă este exprimat prin cantitatea de antibiotic necesară creşterii, comparată cu cantitatea de toleranţă a tulpinei iniţiale. Printre antibiotice, streptomicina este cea mai des incriminată; penicilina, cloromicetina şi hidrazida sînt capabile să determine mai rar fenomenul de dependenţă. Dependenţa faţă de streptomicină este observată la mai multe specii microbiene, ca: meningococi, stafilococi, *Esch. coli*, *Klebsiella*, *B.proteus*, *Pseudomonas*, *Brucella*, *Vibrio*, *B. subtilis*, *Mycobacterium*.

Se pare că în interiorul unei populaţii microbiene dependente, nu toţi indivizii sînt dependenţi.

Mecanismul dependenţei pare legat de faptul că antibioticele pot constitui un factor de creştere pentru asemenea tulpini microbiene. Fenomenul de dependenţă oferă un nou argument, menit să pună în evidenţă relaţiile dintre antibiotice şi metabolismul bacterian.

Durata dependenţei este, de obicei, mai mică decît durata rezistenţei la antibiotic.

Variantele dependente prezintă, faţă de tulpina de origine, unele modificări minore. Printre acestea ar trebui reamintit că morfologia coloniilor nu pare substanţial schimbată; modificări mai însemnate sînt întîlnite la tulpinile de *M. tuberculosis*, care devin, uneori, cromogene.

Virulenţa germenilor dependenţi este mai scăzută decît a tulpinii de origine. Ei dispar mai repede din organismele infectate experimental.

Metode pentru cercetarea acţiunii substanţelor antibiotice

Antibioticele pot fi studiate pentru activitatea pe care o desfăşoară, fie prin titrarea lor după obţinerea pe scară industrială, fie pentru activitatea lor în umorile organismului, fie, în fine, în privinţa activităţii lor faţă de germenii microbieni patogeni.

Metodele de cercetare sînt fizice, chimice şi biologice. Metoda biologică este cea mai des folosită. Această metodă este cea mai sensibilă, ea putînd fi aplicată, atît pentru antibioticele cunoscute şi necunoscute, cît şi pentru amestecuri de antibiotice.

Metoda biologică utilizează diferite procedee, printre care trebuie amintite procedeul diluţiilor, procedeul difuzimetric, procedeul turbidimetric şi procedee experimentale, folosite numai în anumite cercetări. Pentru a se obţine rezultate comparabile, oricare ar fi procedeul biologic folosit, trebuie să se ţină seama, la fiecare examen executat, de:

1. mediul de cultură utilizat;

2. specia microbiană test sau supusă analizei;

3. cantitatea de inocul şi modul de însămînţare;

4. temperatura de incubare şi durata acesteia;
5. rigurozitatea cu care se pregătesc soluţiile standard pentru diferitele antibiotice de cercetat;
6. criterii obiective de apreciere a activităţii antibioticului.

I. *Titrarea activităţii unui preparat antibiotic*

Metoda diluţiilor poate fi efectuată cu ajutorul mediilor lichide sau solide. Procedeul cu mediul lichid este recomandat.

a) Mediul lichid, mai des folosit, este preparat după formula următoare:

extract de carne Lab. Lemco	3 g
peptonă	10 g
manită	1,5 g
clorură de sodiu	3,5 g
apă distilată	1 000 ml

Se dizolvă ingredientele în apă. Se aduce la pH 8, cu ajutorul hidroxidului de sodiu, se fierbe o oră şi se trece prin filtrul Seitz. Se repartizează în tuburi şi se păstrează la temperatura camerei.

b) Specia microbiană test trebuie să fie sensibilă la concentraţii minime de antibiotice, uşor de cultivat şi conservat, să fie de preferinţă nepatogenă şi să nu posede variaţii de sensibilitate la aceste substanţe.

Speciile de germeni recomandate sînt: *B. subtilis* sporulat, tulpina Oxford, stafilococul Oxford, *Lactobacillus bulgaricus* etc. Avantajele cele mai mari le oferă *B. subtilis*, fiindcă se manipulează uşor, se poate păstra la frigider mai multe luni, cultivat formează văl, ceea ce permite observarea uşoară a creşterii sale şi nu este patogen pentru om.

Obţinerea suspensiei de *B. subtilis* se face astfel: se însămînţează tulpina de *B. subtilis* pe plăci Roux, care conţin geloză 2%, pornind de la o cultură pe un tub cu agar. Se incubează la 37°, timp de o săptămînă, pentru sporulaţie intensă. Cultura de pe o placă Roux se reia în 20 ml de apă distilată sterilă. Se încălzeşte suspensia la 55°, timp de 30 de minute, pentru a distruge formele vegetative. Se spală suspensia de spori, în trei rînduri, cu apă bidistilată, se încălzeşte din nou 30 de minute la 65°, se centrifughează şi sedimentul se resuspendă în apă bidistilată. Se poate păstra la frigider mai multe luni.

Se determină o dată pentru toată durata de folosire a acestei preparaţii cantitatea de spori care trebuie adăugată pentru a se putea obţine zone de inhibiţie clare şi largi (în jurul a 0,1 ml sau mai puţin pentru 20ml). Resuspendarea definitivă a suspensiei de spori trebuie să aibe o densitate similară vaccinului TAB.

Obţinerea suspensiei de stafilococ Oxford se efectuează cu ajutorul unei culturi pe un tub de agar de 2% în vîrstă de 24 de ore, suspendată în ser fiziologic şi diluată 1%. Suspensia se prepară în ziua titrării.

c) Pentru însămînţarea mediului folosit la titrarea antibioticelor se foloseşte o picătură din diluţia 1/10 din suspensia de spori de *B. subtilis* sau o picătură din diluţia 1/100 din cultura de stafilococ. Se recomandă însămînţarea bulionului înainte de repartizarea sa în tuburi, pentru ca inoculul să fie omogen.

d) Temperatura şi durata de incubare depind de specia pe care o folosim în analiză. Cînd se foloseşte stafilococul, temperatura poate fi de 40° ; în cazul *B. subtilis*, 37°.

Durata de incubare poate varia de la 60 de minute la 3 zile ; cînd este vorba de *M. tuberculosis*, se aşteaptă mai multe zile.

În majoritatea cazurilor, incubarea peste noapte este suficientă. O durată mai mare decît cea optimă cauzează apariţia de culturi secundare rezistente.

e) Pregătirea soluţiilor standard de antibiotice.

Soluţiile de antibiotice sînt preparate, fie în soluţie de fosfaţi-tampon, fie în apă distilată acidulată, fie numai în apă distilată.

Soluţia de fosfaţi-tampon se pregăteşte astfel :

Se dizolvă 9,078 g fosfat monopotasic anhidru în 1 000 ml apă bidistilată (soluţia *a*).

Se dizolvă pe de altă parte, 11,876 g de fosfat disodic anhidru în 1 000 ml apă distilată (soluţia *b*).

Se amestecă 61 ml din soluţia *a* cu 39 ml din soluţia *b*. Soluţia de fosfaţi-tampon obţinută are pH 7. Această soluţie-tampon serveşte pentru prepararea soluţiei etalon de penicilină. Pentru soluţia-tampon folosită pentru streptomicină se amestecă 91,5 ml soluţia *a* şi 8,5 ml soluţa *b*. Soluţia-tampon obţinută are pH 7,8.

Soluţiile tampon se repartizează în sticluţe de 100 ml şi se sterilizează 20 de minute la 115°.

Apa distilată acidulată se prepară adăugînd 20 de picături din soluţia 1% acid sulfuric în 10 ml apă distilată. Soluţia are pH 4,2—4,5.

Prepararea soluţiilor de antibiotice-etalon se efectuează astfel : se cîntăreşte la balanţa de precizie o cantitate suficientă din antibioticul dorit, a cărui activitate este bine determinată de către laboratoarele internaţionale de referinţe, însărcinate de către Comitetul internaţional de standardizare a antibioticelor. Acest laborator, după anumite convenţii internaţionale livrează antibioticele standard tuturor celor interesaţi. Practic, o unitate internaţională de penicilină este reprezentată de activitatea specifică conţinută în 0,000598 mg din sarea sodică a benzilpenicilinei pure, iar o unitate internaţională de eritromicină, clorhidratul de tetraciclină, oxitetraciclina etc. este reprezentată de 1γ de antibiotic standard. Se va ţine seama foarte riguros de indicaţiile recomandate de către laboratoarele de referinţă pentru cîntărirea şi solventul folosit.

Antibioticul cîntărit se dizolvă într-un solvent apropiat, în aşa fel ca să avem o soluţie-mamă, care se poate păstra mai multe zile în frigider la 4°, fără să-i scadă activitatea.

Pentru penicilină soluţia-mamă se prepară în soluţie tampon cu fosfaţi şi conţine 2 000 u/ml ; pentru streptomicină, eritromicină, viomicină, polimixină, teramicină, cloromicetină, kanamicină şi aureomicină 250 γ/ml, toate aceste antibiotice dizolvîndu-se în apă distilată sterilă, iar activitatea lor rămînînd neschimbată timp de 2-3 săptămîni de la preparare ; pentru aureomicină, solventul este apa distilată, sterilizată, acidulată, activitatea sa rămînînd neschimbată numai 10-15 zile.

Criteriul de activitate a antibioticelor îl constituie „punctul final'' (*endpoint*), care poate fi definit ca cea mai mare diluţie la care creşterea microbiană este complet sau aproape complet inhibată. El poate fi apreciat după aspectul creşterii culturii (omogen sau sedimentat), după gradul de turbiditate, schimbarea de pH, prezenţa sau absenţa hemolizei, cînd se utilizează ca germen-test un germen microbian hemolitic (de obicei streptococi din grupul A Lancefield), lipsa de reducere a unui indicator (de exemplu verdele Janus), stabilirea sterilităţii, apariţia cheagului etc.

Tehnica de lucru: se prepară două serii de cîte 8 tuburi, în care se repartizează mediul de cultură, în fiecare tub punînd 1 ml. În prima serie de tuburi se adaugă, trecînd din tub în tub, diluţiile standard; în a doua serie se repetă acelaşi lucru, însă cu antibioticul manufacturat. În seria cu diluţii standard, se pleacă de la primul tub cu 2 u.i. de penicilină sau cu 100 γ/ml din celelalte antibiotice. Un al 17-lea tub serveşte ca martor pentru cultură.

Se însămînţează toate tuburile cu tulpina aleasă ca organism-test în concentraţiile arătate mai sus. Se incubează peste noapte la 37° Se citeşte „punctul final”, care se determină prin comparaţie cu cantitatea de antibiotic standard.

II. *Titrarea unui antibiotic în umorile organismului*

În clinică, deseori, este necesar să cunoaştem activitatea antibiotică a unei umori, spre pildă ser sanguin, puroi, bilă, urină, lichid cefalorahidian etc., provenite de la un bolnav supus unui tratament cu antibiotice.

Pentru aceasta se procedează în felul următor:

1. Se foloseşte ca mediu de însămînţare: bulion cu pH 7 pentru penicilină, aureomicină şi teramicină, apă peptonată 1% şi glucozată 1% cu pH 8 pentru streptomicină. În ultimul mediu se poate adăuga ca indicator albastru de bromtimol.

2. Însămînţarea se face, după caz, cu un germen cunoscut; astfel: dintr-o cultură de stafilococ sau alt germen aparţinînd familiei enterobacteriaceelor, o ansă în 10 ml mediu; dintr-o cultură de streptococi, două picături, iar din germeni exigenţi, ca menigococi, hemofili etc., o diluţie 1/10 (Terrial).

3. Soluţiile de antibiotic se folosesc cantitativ, în două game diferite: prima gamă:

penicilină	10 u./ml
streptomicină	100 γ/ml
cloromicetină	100 ,,
aureomicină	100 ,,
teramicină	100 ,,

a doua gamă: din soluţiile de mai sus, se fac diluţii 1/16.

4. Diluţiile umorilor de cercetat se obţin astfel:

— serul sanguin (inactivat la 56°, timp de 30 de minute), bila şi lichidul cefalorahidian sînt diluate pînă la 1/256;

— urina se diluează, mai întîi 1/20—1/40, şi din aceste diluţii se pregătesc altele, pentru a se ajunge la diluţia finală de 1/5 120;

— puroiul şi exsudatele sînt diluate, în funcţie de consistenţa lor, în aşa fel ca să poată fi lucrate în condiţii similare cu celelalte produse de cercetat.

5. Temperatura de incubare este de 37°, pînă a doua zi.
6. Schema de lucru este redată în tabelul IV.

Tabelul IV

Numărul tuburilor	1	2	3	4	5	6	7	8	Martor
Ser sau alt produs de examinat	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml apă distilată
Mediul de cultură însămînțat	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Diluția	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	

Din tubul 8 și din tubul martor se îndepărtează 1 ml.

În alte 2 serii de 8 tuburi se efectuează după același procedeu, diluții de antibiotic cunoscut pornind de la prima și a doua gamă. Citirea se face astfel : se notează ultimul tub care a oprit dezvoltarea culturii test în seria cu produsul de examinat și ultimul tub cu antibioticul cunoscut.

Să admitem că diluția de ser sau alt produs de examinat a oprit dezvoltarea pînă la tubul 3 exclusiv, iar soluția standard cunoscută, la tubul 7 inclusiv.

Cunoscînd cantitatea de antibiotic reprezentată prin tubul 7, deducem pe aceea conținută în tubul 2 (cu produsul bolnavului).

Cum în ultimul tub în care nu s-a dezvoltat cultura există o cantitate de antibiotic, se socotește de obicei media cantităților din tubul în care nu s-a dezvoltat și tubul în care s-a dezvoltat. În aceste condiții, pentru aprecierea activității antibioticului ne putem folosi de următoarea formulă : MIC × MDN = conținutul în antibiotic al produsului de examinat, în care MIC = media inhibiției la seria cu concentrații cunoscute (media între ultimul tub în care creșterea este inhibată și primul tub care permite creșterea) ; MDN = media diluțiilor în seria cu concentrații necunoscute (media între ultimul tub care inhibează creșterea și primul tub care o permite).

Prezentăm un exemplu, pentru o mai bună înțelegere a formulei de calcul :

$$\text{MIC} = \frac{0{,}06 + 0{,}03}{2} = \frac{0{,}09}{2} = 0{,}045$$

$$\text{MDN} = \frac{1/32 + 1/64}{2} = \frac{\frac{2}{64} + \frac{1}{64}}{2} = \frac{\frac{3}{64}}{2} = \frac{\frac{1}{21{,}33}}{2} = \frac{1}{21{,}33} \times \frac{1}{2} = \frac{1}{42{,}66}$$

$$\frac{\text{MIC}}{\text{MDN}} = \frac{0{,}045}{\frac{1}{42{,}66}} = 0{,}045 \times 42{,}66 = 1{,}919 \text{ u.}$$

III. *Determinarea sensibilității unui germen microbian la antibiotice (antibiograma)*

Cercetarea sensibilității unui germen microbian la antibiotice poate fi efectuată, fie cu ajutorul metodelor de diluție în mediul lichid, fie pe medii solide.

Metodele folosind diluţii în mediu lichid permit studiul acţiunii bacteriostatice şi al efectului bactericid al antibioticelor izolate şi asociate în condiţii optime; această metodă însă nu este totdeauna practică: ea pretinde prepararea soluţiilor proaspete de antibiotice, consum mare de antibiotic, utilaj de laborator, manoperă laborioasă şi timp.

Metodele pe medii solide sînt rapide şi uşor de executat şi permit o orientare suficientă pentru nevoi clinice. Metodele pe medii solide se bazează pe proprietatea antibioticelor de a difuza în geloză, creînd o zonă circulară în care concentraţiile de antibiotic sînt descrescînde de la centru spre periferie. Antibiograma nu este o analiză riguros exactă; variabilitatea rezultatelor depinde de o serie de factori, ca: mediul de cultură (formula, compoziţia mediului, substanţe nutritive şi factori de creştere, pH, condiţii de aerobioză şi anaerobioză, calităţile fizice ale gelozei întrebuinţate, ca şi conţinutul ei, grosimea mediului, starea lui de uscăciune etc.), germenul microbian de studiat (locul recoltării, însămînţarea cu produs mono- sau polimicrobian, numărul de germeni însămînţaţi, perioada de latenţă a germenului, viteza lui de creştere), antibioticul de cercetat (concentraţia, viteza şi gradul de difuziune, vechimea diluţiei, viteza de acţiune etc.), temperatura şi durata de incubare, tehnica utilizată, condiţii de interpretare etc.

Cu toate acestea, antibiograma rămîne încă o metodă foarte preţioasă pentru instituirea, controlul şi conducerea unui tratament antibioterapic ştiinţific.

Cea mai utilizată tehnică pentru determinarea sensibilităţii germenilor microbieni patogeni la antibiotice, în clinică, este metoda difuzimetrică orizontală, bazată pe difuziunea antibioticului pe suprafaţa gelozei în plăci Petri.

Această metodă se practică după mai multe procedee:

1. **Procedeul cu discuri de hîrtie impregnată cu antibiotice**: în cutii Petri de 10 cm diametru se toarnă 20 ml geloză 2%. După răcire şi solidificare se însămînţează cu 0,5 ml suspensie microbiană de studiat. Se usucă cultura o oră la termostat. Pe suprafaţa mediului însămînţat se aşază rondele impregnate în prealabil cu antibiotice, sau rondele de hîrtie de filtru de 6,5 mm, îmbibate cu 15 u/ml de penicilină şi 250γ/ml de aureomicină, cloromicetină, streptomicină etc. Se incubează 18–24 de ore la 37°, după care se face citirea rezultatelor.

Interpretarea rezultatelor se face după mărimea diametrului de inhibiţie (inclusiv rondelele): peste 15–25 mm germenul cercetat este socotit foarte sensibil, sub 10 mm rezistent.

Metoda de confecţionare a rondelelor este următoarea:

Rondelele de hîrtie de 6,5 mm, sterilizate 15 minute la 120°, sînt impregnate cu ajutorul unui ac de intradermoreacţii (nr. 6 ×12), adaptat printr-un tub de cauciuc la o pipetă gradată de 1 ml, divizată în 100. Acul eliberează o picătură cu un volum de 0,01 ml. Acul, tubul şi pipeta sînt sterilizate prin fierbere. Cu o pensă sterilizată prin flambare se aşază discurile sterilizate, fără să se atingă între ele, într-o cutie Petri sterilă. Se pune pe fiecare disc cîte o picătură din soluţia de antibiotic şi se lasă să se usuce. După uscare, rondelele impregnate sînt ţinute la +4° în eprubete parafinate. Discurile cu penicilină se conservă cel puţin 2 luni, iar cu celelalte antibiotice cel puţin 6 luni.

2. **Procedeul Erna Lund** : mediul agar 2%, preparat fără peptonă, glucozat 1%, amestecat cu sînge lacat de cal în proporție de 10%; tehnica este asemănătoare procedeului precedent, însă discurile au un diametru de 15 mm, iar concentrația de antibiotice este următoarea: penicilină 200 u/ml, cloromicetină și aureomicină 1 000 γ/ml, streptomicină 10 000 γ/ml.

Din aceste diluții se pune pe suprafața discurilor, cu ajutorul unor pipete de precizie, cîte 0,05 ml de antibiotic.

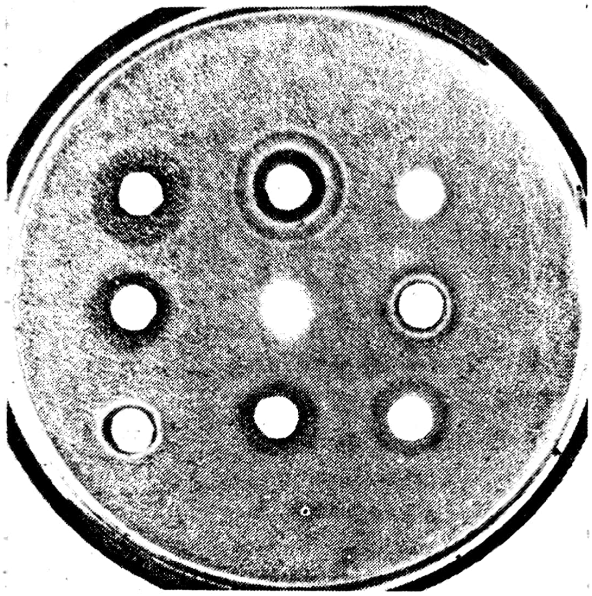


Fig. 46. — Determinarea sensibilității la antibiotice prin metoda Erna Lund.

Interpretarea este următoarea :

0—15 mm = rezistent
16—20 mm = relativ rezistent
21—29 mm = moderat sensibil
30 mm și peste = foarte sensibil

3. **Procedeul cu pulberi de antibiotice** : este o metodă de orientare rapidă; tehnica de preparare a mediului de cultură și a culturilor de germeni de studiat sînt asemănătoare celor descrise anterior.

Procedeul folosește pulberi cu antibiotice în locul rondelelor impregnate. Prepararea pulberilor cu antibiotice, după indicațiile lui Balș, se fac astfel :

a) Se folosește amidon *(amilum tritici)*, granulat, sterilizat la căldură uscată și ulterior măcinat fin, în pulbere omogenă.

b) Pulberea de penicilină se prepară astfel : 1 flacon de dipenicilină de 200000 u. se amestecă cu 10 g amidon. Se omogenizează. Din acest amestec se ia 1 g, care se amestecă cu 9 g amidon. Se omogenizeză. Din acest amestec, denumit pulbere-mamă, se ia 1 g care se amestecă cu 1 g amidon, obținînd astfel o pulbere care conține 1000 u/g.

Pentru antibiograme se folosește acest ultim amestec.

c) Pulberea de streptomicină se obține în felul următor : streptomicină 1 g este omogenizată cu 9 g amidon. Din acest produs se ia 1 g, care se amestecă cu 9 g amidon; 1 g din acest ultim amestec omogenizat cu 1 g de amidon are o activitate de 5000 γ/g, care se utilizează în practică.

d) Aureomicina, tetraciclina și hostaciclina, precum și cloromicetina se aduc în același fel tot la o concentrație de 5000 γ/g.

e) Se pot utiliza și pulberi obținute din amestecuri de antibiotice.

Practicarea antibiogramei cu ajutorul pulberilor de antibiotice se efectuează în aceleași condiții ca și practicarea după procedeele arătate mai sus, cu deosebirea că în locul rondelelor, impregnate, se depun cu o ansă dreaptă de sîrmă, cu capătul ușor lățit, mici cantități de antibiotice (grămezi de 4—5 mm diametru).

Incubarea, citirea și interpretarea antibiogramei se fac în aceleași condiții indicate la procedeele mai sus descrise. Procedeul cu pulberi de antibiotice este comod pentru laboratoarele de spital și se folosește destul de larg.

Bacteriofagul şi fenomenele de bacteriofagie

Dr. MARCELLA POPOVICI

Bacteriofagul se încadrează printre agenţii biologici cu efect distrugător asupra bacteriilor. Fenomenul de bacteriofagie, observat de foarte multă vreme, are drept efect vizibil liza bacteriană.

Clasificare. Taxonomia şi nomenclatura bacteriofagilor sînt încă nesatisfăcătoare, datorită lipsei unor criterii valabile pentru a defini limitele speciilor şi genurilor printre bacteriofagi (Adams, 1959).

Bacteriofagii sînt incluşi astăzi ca un subgrup separat în Ordinul ,,*Virales*'' care face parte, la rîndul său, din Clasa ,,*Microtatobiotes*''.

Istoric. Ca fapte de observaţie disparate, fenomene de liză bacteriană au fost semnalate de diferiţi cercetători, încă începînd de la sfîrşitul veacului trecut.

Astfel, în 1896, Hankin a observat că apa rîurilor Gange şi Jumna din India posedă capacitatea de a liza vibrionii holerici. Observaţii similare au făcut Frankland pentru apa Tamisei, San Giorge şi Varcelano pentru apa rîului Pad. De asemenea, în 1898, Gamaleia a observat clarificarea, în anumite condiţii, a suspensiei de bacili cărbunoşi, fenomen pe care l-a atribuit unei bacteriolizine.

Cel care însă a atras atenţia şi a descris fenomenul lizei bacteriofagice a fost Twort, în 1915. În cursul cercetărilor sale asupra virusului vaccinal făcînd însămînţări din limfa vaccinală glicerinată, Twort a observat printre coloniile de stafilococ dezvoltate, un polimorfism accentuat. Unele din ele prezentau o transformare vitroasă, urmată de o adevărată topire. Coloniile modificate erau capabile să imprime unei culturi normale de stafilococ transformări morfologice asemănătoare. Mai departe, filtrînd cultura provenind dintr-o colonie modificată, se obţinea un filtrat capabil să reproducă fenomenul; ,,principiul litic'' se dovedea astfel a fi un element filtrabil.

În 1917, d'Hérelle a descris, în mod cu totul independent de cercetările lui Twort, un principiu litic izolat din materiile fecale ale bolnavilor şi convalescenţilor de dizenterie şi pe care l-a denumit bacteriofag.

În următorii 48 de ani, cercetările asupra naturii bacteriofagilor, asupra raporturilor fag-bacterie, asupra relaţiilor epidemiologice ale diferitelor boli infecţioase cu prezenţa fagilor, asupra folosirii bacteriofagilor în terapeutică, epidemiologie şi diagnostic însumează un vast material de cercetare ştiinţifică.

Un moment important în ansamblul acestor cercetări asupra bacteriofagilor îl constituie descoperirea ,,bacteriilor lizogene'', a acelor bacterii capabile de a produce bacteriofagi cu acţiune litică asupra altor bacterii. Primele tulpini lizogene au fost obţinute în mod experimental de către Bordet şi Ciucă, în 1920—1921, din tulpini lizosensibile de *Esch. coli*, supuse acţiunii fagului enteric d'Hérelle. În 1922, Lisbonne şi Carèrre au descris primele tulpini lizogene printre culturile de colecţie. Astăzi se atribuie tulpinilor lizogene un rol important în menţinerea şi persistenţa fagilor în natură, în patogenia şi epidemiologia infecţiilor bacteriene, precum şi în studiile de genetică bacteriană.

Folosirea microscopiei electronice în studiile asupra bacteriofagilor, efectuată prima oară de către Ruska (1940), şi ulterior de alţi cercetători, a permis precizarea morfologiei corpusculare a acestora şi a mecanismului lizei transmisibile, punînd totodată capăt unei îndelungate controverse asupra naturii bacteriofagului.

Importantele aplicaţii ale fenomenului de bacteriofagie în epidemiologia bolilor infecţioase au ca punct de plecare descoperirea fagilor ,,Vi'' anti- *S.typhi* de către Craigie şi Brandon, Sertic şi Boulgakov, Scholtens (1936), diferenţierile obţinute cu ajutorul metodei lizotipiei căpătînd ulterior o extindere largă, în cadrul a numeroase specii bacteriene.

Terminologia folosită la studiul fenomenelor de bacteriofagie

(după Jacob, 1954)

Bacterie receptivă este bacteria capabilă de a adsorbi pe suprafaţa corpului bacterian corpusculi fagici.

Bacterie lizosensibilă este bacteria care, după ce a adsorbit fagul, permite multiplicarea acestuia în interiorul ei, după care suferă fenomenul de liză.

Bacterie lizorezistentă este bacteria care rezistă acţiunii fagului, fie pentru că nu este receptivă, fie pentru că, deşi adsoarbe fagul, îl neutralizează după pătrunderea în celulă, fie pentru că fagul, o dată pătruns în celulă, rămîne în simbioză cu ea, bacteria devenind lizogenă.

Bacterie lizogenă este bacteria capabilă a perpetua capacitatea de a produce bacteriofagi.

În ce priveşte *bacteriofagul*, care prezintă un proces evolutiv bifazic — ciclul lizogen şi ciclul litic — terminologia folosită este următoarea :

Bacteriofag simbiotic (sinonime : fag lizogen, profag, fag imatur sau fag endogen) este fagul purtat de bacteriile lizogene, care se înmulţeşte o dată cu celula-gazdă, fără a cauza liza acesteia.

Capacitatea de lizogenizare este acţiunea unui bacteriofag de a conferi lizogenie unei bacterii nelizogene.

Bacteriofag temperat este fagul capabil să stabilească ambele feluri de raporturi cu celula gazdă :

— lizogenizare
— liză.

Inducția este dezvoltarea profagului în fag litic, sub influența agenților inductori.

Agenții inductori sînt agenți fizici sau chimici capabili să efectueze inducția celulei lizogene ; de exemplu, razele ultraviolete, șocul termic, razele X, schimbările bruște de mediu, peroxizii, iperita, apa oxigenată, substanțele mutagene, cancerigene etc.

Aptitudine este condiția fiziologică ce permite bacteriilor lizogene să reacționeze la acțiunea agenților inductori, prin dezvoltarea profagului în fag litic.

Bacteriofag litic este fagul capabil să se multiplice în interiorul bacteriei sensibile care l-a adsobit, determinînd liza acesteia.

Bacteriofag virulent : fagul care în prezența celulei lizosensibile produce în mod obligator liza acesteia neputînd stabili relații de simbioză.

Habitat. Bacteriofagii se întîlnesc în natură în cavitățile naturale ale omului și animalelor, în excretele acestora, în produse patologice, în apă, sol și uneori chiar și în aer. Aria de distribuire a bacteriofagilor în mediul extern corespunde, de fapt, ariei de răspîndire a bacteriilor.

La nou născut, prezența bacteriofagilor în intestin se constată începînd de la cîteva ore sau cîteva zile de la naștere, o dată cu apariția florei intestinale. În scaunele bolnavilor sau ale convalescenților de boli enterice, prezența bacteriofagilor variază cu specia microbiană. Din intestin, bacteriofagii sînt diseminați în mediu, fiind găsiți apoi în ape, sol etc. Numeroși cercetători, printre care : Ciucă și colaboratorii, Serghienko, Boyd și alții, consideră că originea bacteriofagului în natură este strîns legată de prezența tulpinilor lizogene (purtătoare de fag).

Caractere morfologice ale bacteriofagilor

Pe baza cercetărilor de microscopie electronică efectuate de către Ruska (1940), precum și de Luria, Delbrück și Anderson (1943), s-a putut stabili că bacteriofagii în stadiul litic au o morfologie reală. În genere, ei prezintă un cap care poate avea, fie o formă rotundă, corpusculară, fie de bastonaș alungit, fie cu aspect de prismă hexagonală, fiind prevăzuți la o extremitate cu o coadă. Capul este înconjurat de o membrană de constituție proteică avînd un conținut bogat în acizi nucleici. Coada pare a fi un organ specializat pentru atașarea fagului pe suprafața bacteriei. În structura cozii s-a descris un ax central rigid alcătuit din proteine cu vîscozitate ridicată, cu un înveliș tubular la exterior.

În structura cozii s-au diferențiat trei zone : zona proximală contractilă, zona fibrilară și zona enzimatică.

Dimensiuni. Aprecierea dimensiunilor particulelor de fag se efectuează mai ales prin ultrafiltrare (în raport cu dimensiunile porilor, membranelor prin care poate trece particula de fag). Folosirea metodelor moderne de ultracentrifugare a permis, de asemenea, calcularea dimensiunilor unor particule fagice, în raport cu constantele de sedimentare. Pentru determinarea dimensiunilor bacteriofagilor s-au mai utilizat unele radiații ionizante, printre care raze X și particule α, determinările făcîndu-se cu ajutorul teoriei țintei.

În fine, o altă cale de măsurare a dimensiunilor particulelor fagice este microscopia electronică, prin măsurarea umbrelor pe imaginile electronografice.

În raport cu datele obţinute prin aceste diferite metode, dimensiunile corpusculilor fagici sînt cuprinse între 16 şi 90 m μ (Adams, 1959).

Constituţia chimică. Pentru determinarea compoziţiei chimice a bacteriofagului a fost necesară obţinerea lui în stare concentrată, purificată şi primul care a reuşit purificarea bacteriofagului a fost Schlessinger, în 1933. Mai tîrziu, Northrop şi alţii au concentrat diferiţi bacteriofagi (antistafilococic, anticoli etc.), cu ajutorul tehnicilor de purificare a enzimelor.

Analize aprofundate asupra compoziţiei chimice au fost efectuate pentru fagul stafilococic, fagul Coli T_2 şi grupul fagilor înrudiţi cu acesta.

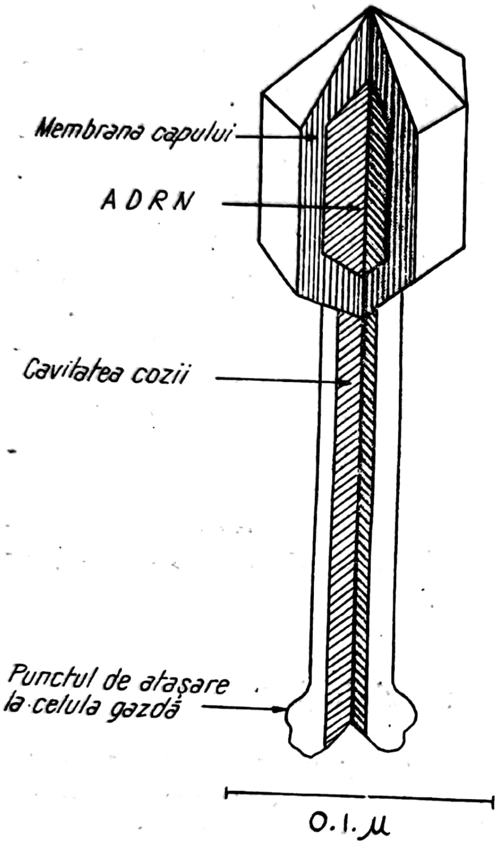


Fig. 47. — Schema părţilor constituente ale unui corpuscul fagic.

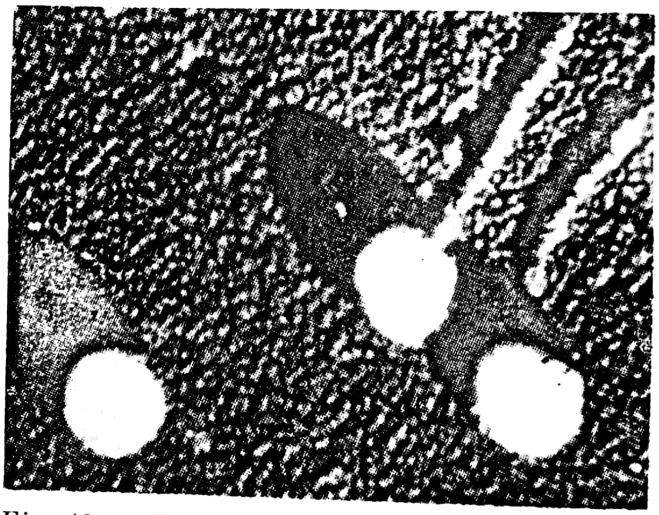


Fig. 48. — Corpusculi fagici (imagine electronografică).

Bacteriofagii analizaţi au arătat un conţinut de 50% proteine, 40% acid dezoxiribonucleic, 1–6% acid ribonucleic, 2% lipoizi, 1 – 3% hidraţi de carbon. Acidul dezoxiribonucleic se găseşte mai ales la nivelul capului. Între structura chimică a bacteriofagilor şi aceea a virusurilor apar diferenţe importante, mai ales prin conţinutul în acizi nucleici, virusurile prezentînd doar cantităţi mici de acid dezoxiribonucleic şi mai mari de acid ribonucleic. După datele lui Hershey şi Chase, acidul dezoxiribonucleic fagic se caracterizează prin absenţa citozinei şi a sulfului, cu prezenţa fosforului.

În ce priveşte proteinele fagice, localizate mai ales în membrană, ele nu conţin fosfor, dar conţin sulf.

Dacă pentru fagul în stadiu litic se cunosc detalii de morfologie şi structură, pentru fagul în stadiu simbiotic nu s-au obţinut pînă în prezent imagini „structurale" vizibile, existenţa sa fiind dovedită numai prin reacţii biochimice, biologice şi biofizice, folosind atomi marcaţi.

Caractere biologice

A. Fagul în stadiul litic (productiv). În prezența unei culturi lizosensibile tinere, fagul litic produce liza elementelor bacteriene. Liza bacteriofagică manifestă aspecte diferite, după cum se petrece în mediu lichid sau pe mediu solid.

În primul caz, liza bacteriofagică se traduce prin clarificarea culturii, în al doilea caz, prin apariția zonelor clare, lipsite de cultură, pe locul unde a fost depus fagul. Aceste zone de liză sînt cunoscute sub numele de plaje, care pot fi de forme și dimensiuni variabile.

Parazit obligatoriu al celulelor bacteriene vii în faza de multiplicare activă, bacteriofagul este transmisibil în serie, capacitatea lui litică crescînd în proporții indefinite.

Mecanismul lizei bacteriofagice. Fenomenul lizei bacteriofagice a fost descris de d'Hérelle ca efectuîndu-se în următoarele stadii :

— adsorbția particulei fagice pe celula-gazdă ;

— pătrunderea ei în bacterie ;

— înmulțirea intracelulară a fagului ;

— liza bacteriei și liberarea noilor particule fagice în mediu.

Metodele noi de investigație, printre care microscopia electronică și folosirea atomilor marcați, au permis cunoașterea pînă la un anumit punct a mecanismului de producere a lizei bacteriofagice. Potrivit acestor date, primul raport pe care-l au fagii cu celula bacteriană gazdă este *un fenomen fizico-chimic de adsorbție.* Bacteriofagii printr-un tactism care se stabilește, se mișcă, cu ajutorul cozii, în direcția celulei bacteriene sensibile. Urmează adsorbția, fixarea fagului prin coadă la suprafața corpului bacterian. Fenomenul de adsorbție pare condiționat de o serie de factori, printre care : mediul cu o anumită concentrație ionică, prezența anumi-

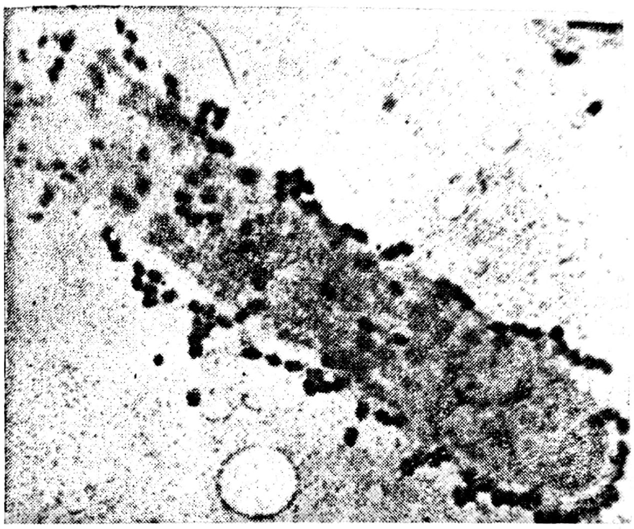


Fig. 49. — Corpusculi fagici adsorbiți pe corpul bacterian (imagine electronografică, × 20 000).

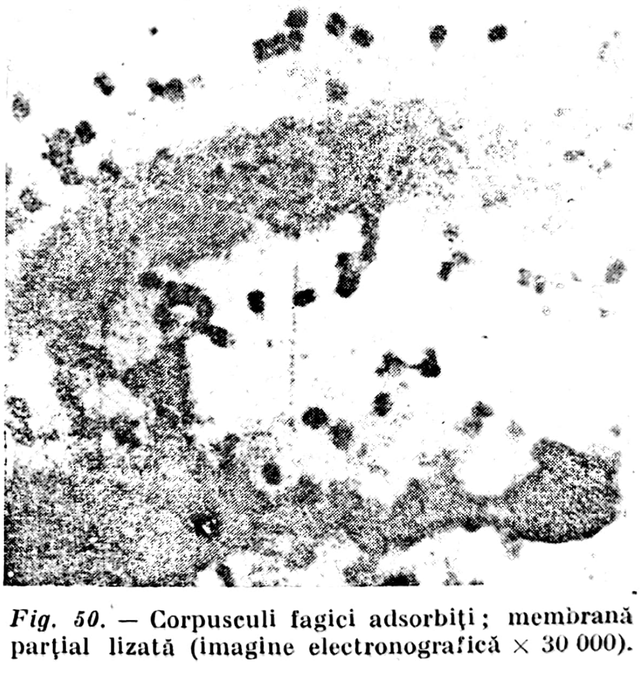


Fig. 50. — Corpusculi fagici adsorbiți ; membrană parțial lizată (imagine electronografică × 30 000).

tor acizi aminați (de exemplu, triptofan), o anumită temperatură, specia microbiană etc. Adsorbția particulelor de fag se face în două etape : reversibilă și ireversibilă.

Proporția de fixare a fagului pe celula-gazdă este legată de concentrația fagului și de starea fiziologică a celulei.

Viteza de adsorbție și numărul corpusculilor adsorbiți sînt în raport cu suprafața bacteriei.

Unii autori susțin că adsorbția are loc numai pe celula sensibilă (d'Hérelle, Beumer). Alții (H. Smith) susțin că fenomenul de adsorbție poate avea loc și pe celule lizorezistente.

Pătrunderea fagului în bacterie. Acest fenomen pare a fi condiționat de o acțiune enzimatică. Folosind fagul Coli T_2 marcat cu fosfor și sulf radioactiv, Hershey și Chase (1952) au stabilit că numai o parte din particula de fag pătrunde în celula-gazdă, aceasta fiind constituită din acidul dezoxiribonucleic conținut în cap, în timp ce proteina legată de membrană rămîne în afara bacteriei.

În momentul pătrunderii, circa 80% din acidul dezoxiribonucleic fagic trece în celula parazitată, restul de 20% pierzîndu-se în mediul de cultură.

Multiplicarea fagului. Asupra mecanismului de multiplicare intracelulară a fagului, cunoștințele sînt mai puțin clare.

Urmărindu-se metabolismul acidului dezoxiribonucleic fagic, s-a conchis că fagul posedă totuși un metabolism propriu și că din momentul pătrunderii lui, în celulă apar modificări profunde de metabolism, încetează sinteza anumitor enzime, se oprește diviziunea celulei.

Între acidul dezoxiribonucleic fagic și cel celular se observă deosebiri privind, pe de o parte, cantitatea componentelor (proporție mai ridicată de adenină decît de guanină în primul caz, și invers), iar pe de alta, aranjări deosebite în structura elementelor constitutive. Graham (1950), studiind soarta acidului dezoxiribonucleic fagic după pătrunderea în celulă, arată că sub influența dezoxiribonucleazei celulare acesta este desfăcut, urmînd apoi, după cum a arătat Evans, sinteza unui acid dezoxiribonucleic de nouă factură, la a cărui producere participă, atît acidul dezoxiribonucleic fagic, cît și cel celular. O dată cu sinteza acidului dezoxiribonucleic fagic are loc și sinteza proteinei fagice, ducînd la formarea de noi particule. După maturarea acestora, în intervalul unei perioade de latență, are loc liza celulei bacteriene gazdă, cu punerea în libertate în mediu, a noilor corpusculi. Mecanismul ultim al lizei fagice pare a fi de natură enzimatică.

Relativ la soarta membranei celulare, părerile sînt astăzi împărțite. Lwoff, Guttmann și alții susțin ruperea membranei și liberarea în mediu a noilor particule fagice. Alții consideră fagii ca macromolecule gigante, capabile să străbată membrana.

În mediul lichid, acestui ciclu litic îi urmează altele, pînă cînd toate bacteriile sensibile sînt lizate și cultura se clarifică păstrînd acest caracter indefinit. Dacă în populația microbiană există și variante fagorezistente, acestea supraviețuiesc și vor tulbura din nou mediul, prin multiplicarea lor ulterioară.

Pe medii solide liza bacteriofagică se manifestă, așa după cum s-a arătat, prin apariția de zone clare, numite plaje.

Dimensiunile și morfologia plajelor sînt caracteristice pentru diferite sisteme fago-bacteriene și pot varia pentru diferiți fagi crescuți pe aceeași cultură-gazdă sau pentru același fag, crescut pe diferite gazde bacteriene. Dimensiunile plajelor cresc în timpul incubației, ajungînd la un maximum după 8–12 ore. În cazul dezvoltării lente a culturii bacteriene, datorită unui fenomen de interferență, dimensiunile plajelor sînt reduse.

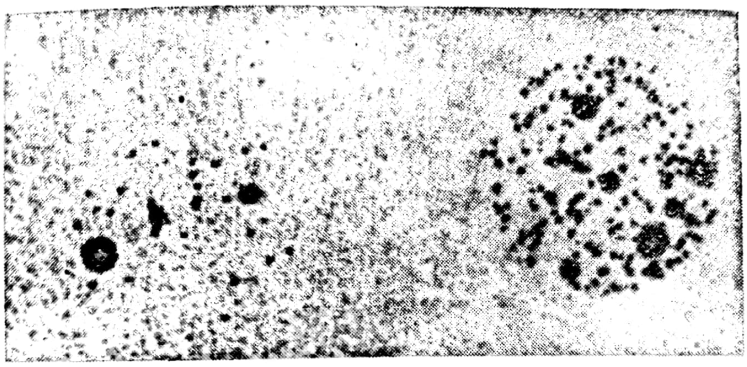


Fig. 51. — Forme și dimensiuni variate de plaje.

Alți factori care par a influența dimensiunile plajelor sînt : mărimea particulelor de virus, viteza de difuziune, viteza de adsorbție (Kriviski a arătat că o viteză de adsorbție mică produce plaje mici, o viteză mare, plaje mari), perioada de latență, concentrația agarului (geloza moale favorizează apariția de plaje mari) etc.

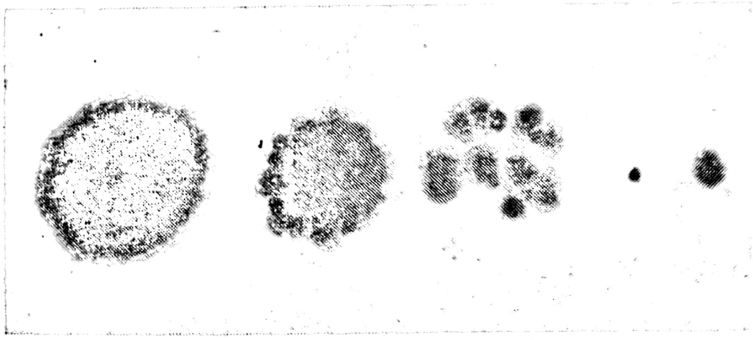


Fig. 52. — Plaje umbrite.

Prin confluarea mai multor plaje se produc zone de liză confluentă.

În cazul în care în populația microbiană există variante fagorezistente, acestea vor dezvolta colonii pe aria de liză.

Dacă numărul de bacterii rezistente este foarte mare, întreaga suprafață a ariei de liză este umbrită de un strat de cultură rezistentă claritatea sau opacitatea plajelor constituind, de asemenea, o caracteristică a sistemului fag-bacterie în cauză.

B. **Fagul în stadiu simbiotic.** Al doilea raport care se poate stabili între fag și bacterie, după pătrunderea lui în citoplasma bacteriană, este o stare de echilibru, de simbioză cu celula, este starea de lizogenie (infecție reductivă). În această situație, celula supraviețuiește și capătă capacitatea de a perpetua fagi fără intervenția fagilor exogeni, capacitate care se transmite ereditar, bacteria devine *lizogenă*.

Nu însă toate specimenele de fagi pot suferi ambele cicluri de dezvoltare și din acest punct de vedere trebuie deosebiți : 1) fagi temperați, care sînt capabili a stabili ambele feluri de raporturi cu bacteria gazdă şi 2) fagi virulenţi, care o dată pătrunşi în celula bacteriană, produc în mod invariabil liza celulei.

În stadiul simbiotic, fagul purtînd denumiri variate — fag latent, fag imatur, profag, fag nevirulent, fag neinfectant — se multiplică o dată cu celula-gazdă. Privitor la localizarea profagului în celulă şi la relaţiile lui cu constituenţii celulari, pare astăzi în general admis că el este localizat pe cromozomul bacterian, adăugat într-un loc anumit, fiind încorporat în aparatul genetic al bacteriei.

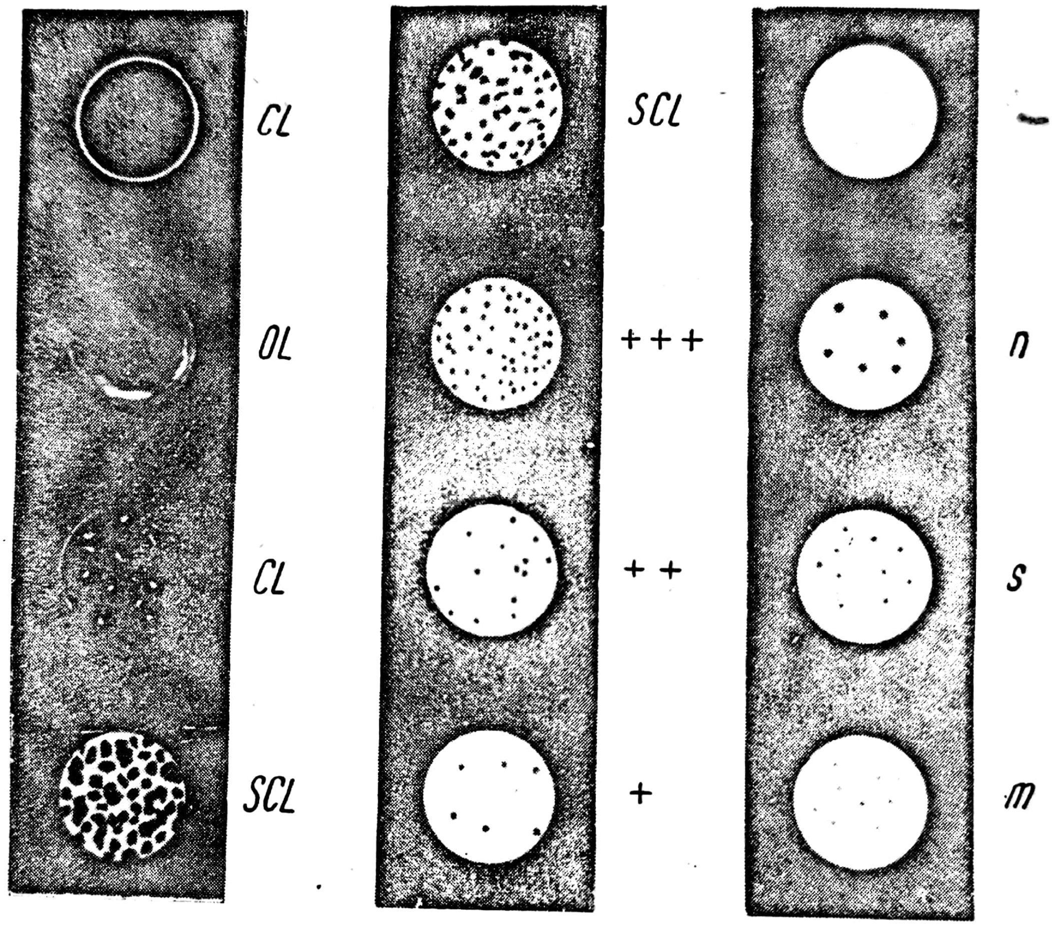


Fig. 53. — Schema şi modul de notare a gradelor de liză bacteriofagică pe medii solide

CL = liză confluentă
SCL = liză semiconfluentă
OL = liză opacă (cu cultură secundară groasă)
+ + + = aproximativ 100 plaje
+ + = aproximativ 50 plaje
+ = 20 – 30 plaje
± = cîteva plaje
— = liză absentă
n = plaje de dimensiuni normale
s = plaje mici, la limita vizibilităţii cu ochiul liber
m = plaje vizibile la lupă.

Prezenţa profagului nu afectează celula decît dacă echilibrul dintre ei este tulburat, cînd profagul se desprinde de cromozom, se maturează, sînt capabili a stabili ambele feluri de raporturi cu bacteria gazdă şi 2) fagi virulenţi, care o dată pătrunşi în celula bacteriană, produc în mod invariabil liza celulei.

În stadiul simbiotic, fagul purtînd denumiri variate — fag latent, fag imatur, profag, fag nevirulent, fag neinfectant — se multiplică o dată cu celula-gazdă. Privitor la localizarea profagului în celulă şi la relaţiile lui cu constituenţii celulari, pare astăzi în general admis că el este localizat pe cromozomul bacterian, adăugat într-un loc anumit, fiind încorporat în aparatul genetic al bacteriei.

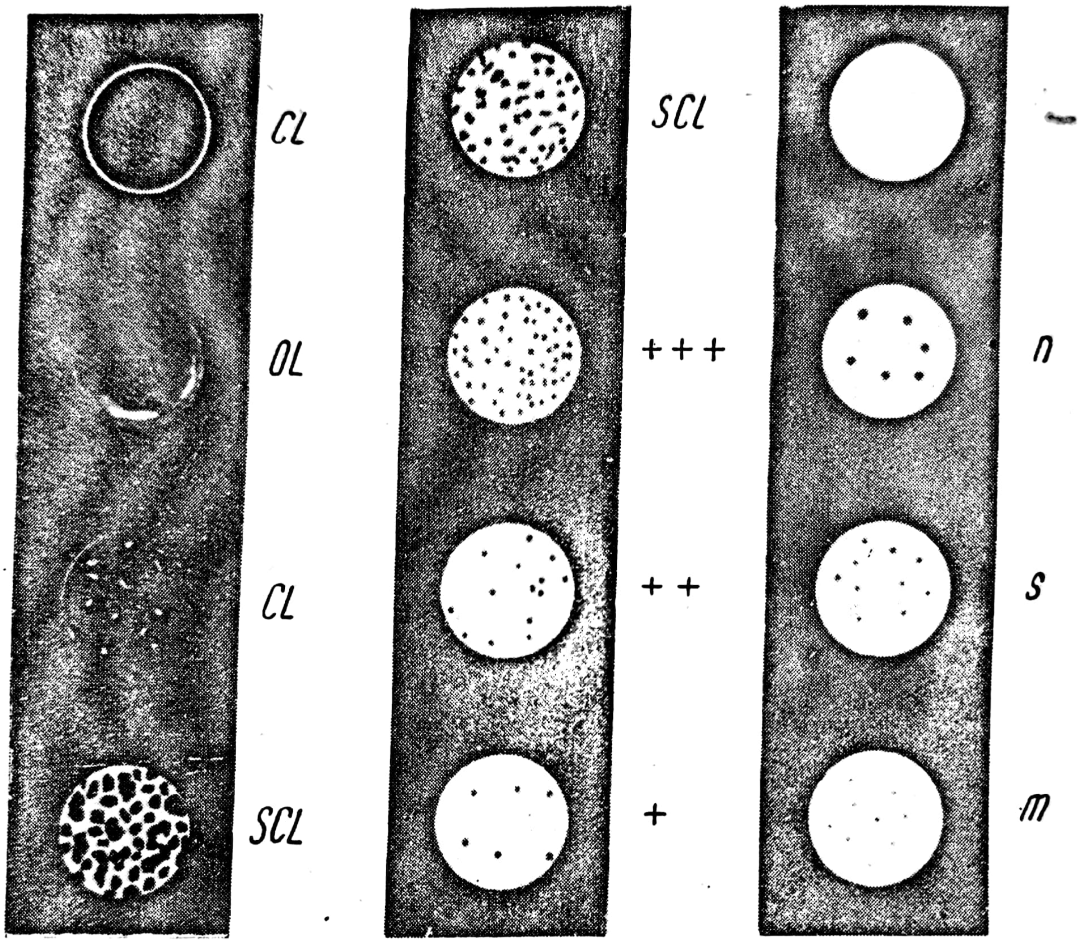


Fig. 53. — Schema şi modul de notare a gradelor de liză bacteriofagică pe medii solide

CL = liză confluentă
SCL = liză semiconfluentă
OL = liză opacă (cu cultură secundară groasă)
+ + + = aproximativ 100 plaje
+ + = aproximativ 50 plaje
+ = 20—30 plaje
± = cîteva plaje
— = liză absentă
n = plaje de dimensiuni normale
s = plaje mici, la limita vizibilităţii cu ochiul liber
m = plaje vizibile la lupă.

Prezenţa profagului nu afectează celula decît dacă echilibrul dintre ei este tulburat, cînd profagul se desprinde de cromozom, se maturează, se multiplică în mod productiv și determină liza celulei, fagul reintrînd astfel în stadiul litic.

Transformarea profagului în fag matur cu acțiune litică se face de obicei sub influența agenților inductori. În mod spontan constituie un incident, rar și fără repercusiuni semnificative asupra populației microbiene, luate ca un tot (Boyd, 1956).

Prezența profagului conferă celulelor lizogene anumite proprietăți.

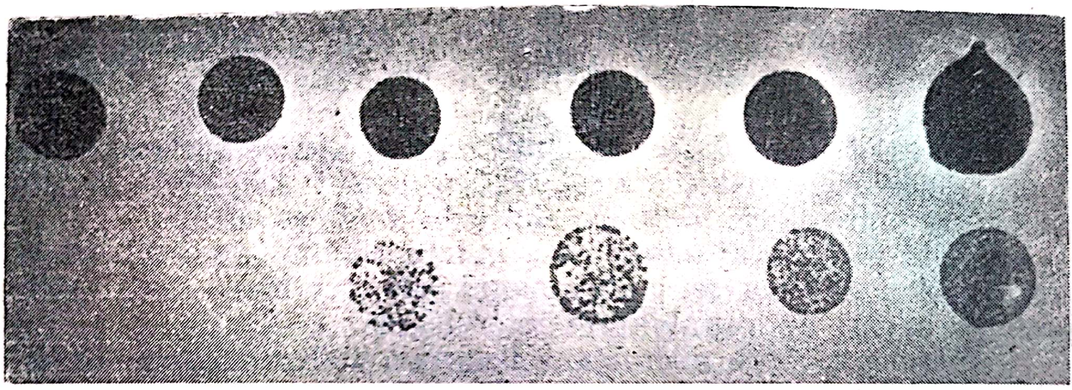


Fig. 54. — Diferite grade de liză : de la liză confluentă la cîteva plaje (titrarea unui bacteriofag).

Caracterele bacteriilor lizogene

1. Așa cum s-a arătat, bacteriile lizogene au capacitatea de a perpetua bacteriofagul imatur în generații succesive, putînd elabora, la un moment dat, fag litic, sub influența agenților inductori.

Aceeași celulă lizogenă poate purta concomitent doi sau mai mulți profagi (Rountree, în 1949, a diferențiat 5 fagi deosebiți în aceeași celulă de stafilococ). Între acești profagi se pot stabili mai multe feluri de relații : corelație, excluzie mutuală și combinare între ei.

2. A doua trăsătură fundamentală a bacteriilor lizogene este starea de rezistență față de fagul omolog și fagii înrudiți, imprimată de prezența fagului latent. Imunitatea bacteriilor lizogene îmbracă aspectul de premuniție, starea de rezistență dispărînd o dată cu maturarea profagului.

Mecanismul acestei rezistențe este explicat prin aceea că fagul omolog superinfectant poate fi adsorbit pe suprafața celulei lizogene, dar o dată pătruns în bacterie nu se multiplică, constituie o particulă protoplasmică inertă(Lwoff, 1955). Această imunitate reflectă blocarea multiplicării fagilor omologi, ca o consecință a prezenței profagului.

Datorită acestor manifestări de imunitate, lizogenia antrenează și modificări în spectrul de sensibilitate al bacteriei la diferiți fagi, fiind bine cunoscut astăzi rolul fagilor latenți în determinarea tipului bacteriofagic al unei tulpine microbiene. Față de fagii heterologi, răspunsul bacteriei lizogene rămîne în genere nemodificat.

3. Prezența profagului imprimă celulei lizogene prin mecanismul conversiei (vezi Capitolul „Elemente de genetică microbiană'') variate

modificări de metabolism, şi un exemplu devenit clasic, de variantă metabolică apărută sub influenţa fagului latent, îl constituie variantele toxigene de *C. diphtheriae*. Legătura între toxigeneză şi lizogenitate la *C. diphtheriae* a fost demonstrată, încă din 1951, de către Freeman. Tulpini netoxice de *C. diphtheriae* pot deveni lizogene şi în acelaşi timp toxigene sub influenţa fagului litic. Cercetările lui Hewitt, Groman, Barksdale, Pappenheimer şi, la noi în ţară, Ciucă, Saragea, Calalb şi colaboratorii, au scos în evidenţă legătura dintre toxigeneză şi lizogenie, explicabilă prin profunde modificări metabolice în celula-gazdă.

Tot ca modificări metabolice s-au semnalat modificări de virulenţă la *S. typhimurium*, precum şi modificări ale caracterelor biochimice la *S.typhi*.

Modificări de morfologie a coloniilor la *Esch. coli* : variante mucoase, variante uleioase (Bordet şi Ciucă, 1921); au fost semnalate, modificări de structură antigenică la unele enterobacteriacee etc.

Datorită acestei capacităţi de a induce tulpinilor microbiene modificarea diferitelor caractere, bacteriofagul este socotit ca unul din cei mai importanţi agenţi de variabilitate microbiană.

4. Într-o populaţie microbiană lizogenă, starea de lizogenie se consideră apanajul tuturor sau majorităţii celulelor bacteriene.

5. Sporii s-au dovedit capabili să transmită caracterul de lizogenie.

6. Transferul lizogeniei între germeni de aceeaşi specie sau de specii diferite a fost obţinut pe cale experimentală, de exemplu transferul lizogeniei de la tulpina „Coli M” la tulpina *S. typhi* O_{901} (Ciucă, Popovici, Nestorescu şi colaboratorii, 1955).

7. Stadiul de profag constituie un stadiu imatur. În această stare, efectuînd liza bacteriei prin agenţi mecanici sau enzimatici (lizozim), nu se obţine eliberarea de fag litic.

8. Prin tratare cu ser antifag omolog, Ciucă a obţinut vindecarea de lizogenie (celulele lizogene pierd profagul şi devin lizosensibile).

9. Incidenţa tulpinilor spontan lizogene s-a dovedit foarte ridicată ; Boyd (1950–51) a demonstrat lizogenitatea la majoritatea tulpinilor de *S. typhimurium*.

În acest domeniu, şcoala romînească, condusă de M. Ciucă, a efectuat numeroase cercetări. Astfel, în cazul *S. paratyphi B* s-a obţinut o incidenţă de 95,46 %, iar pentru alte specii de Salmonella, una de 15–50 % printre tulpinile de *Sh. flexneri* s-a observat o incidenţă de 33–36 % tulpini lizogene. În cercetări recente (1960), Ciucă, Popovici, Nestorescu şi Alexenco au pus în evidenţă lizogenia la 83 % dintre stafilococii patogeni.

10. Prin capacitatea lor de a perpetua fagul şi prin incidenţa lor atît de ridicată bacteriile lizogene ocupă un rol principal în originea şi menţinerea fagului în natură.

* * *

Transducţia. Anumite specimene de fagi temperaţi s-au arătat capabile de a purta diferite porţiuni de material genetic şi, o dată cu acestea, diferite caractere de la o bacterie donatoare, pe care ei s-au înmulţit, pe una receptoare, pe care o infectează (Zinder şi Lederberg, 1952 ; Zinder, 1953).

Caracteristicele fagilor litici

Specificitatea constituie o importantă caracteristică a bacteriofagilor; d'Hérelle, reuşind să obţină efecte litice cu ajutorul fagului anti-Shiga şi la alte enterobacteriacee (*Escherichia*, *Salmonella*), a considerat corpusculul fagic unic şi adaptabil la toate speciile microbiene. Folosirea noilor metode de investigaţie a permis însă diferenţierea a numeroase specimene de bacteriofag deosebite prin variate caractere, printre care : termorezistenţă, dimensiuni, formă, sarcină electrică, antigenicitate etc. În 1921 Gratia a demonstrat inactivitatea fagului stafilococic faţă de germenii intestinali şi specificitatea serurilor antifag coli şi stafilococic. Astăzi, noţiunea de specificitate a bacteriofagilor este bine stabilită. Pentru a se putea explica mecanismul specificităţii s-au acuzat, rînd pe rînd, relaţiile între caracterele serologice ale fagilor şi comportarea lor litică, relaţiile între structura antigenică a bacteriilor şi lizosensibilitatea lor, existenţa anumitor particularităţi metabolice la celulele lizosensibile, prezenţa unor receptori specifici etc. Cel care s-a ocupat în mod special de problema fixării fagilor pe anumiţi receptori bacterieni a fost Beumer care a arătat că la bacteriile sensibile există receptori specifici pentru fag, care determină în oarecare măsură specificitatea de adsorbţie a bacteriofagilor. Dar adsorbţia după cum s-a arătat, nu constituie decît o etapă în fenomenul de liză. Îndeplinirea ciclului evolutiv al fagului necesită un lanţ de reacţii, întreruperea unei singure verigi, putînd cauza rezistenţa germenului.

Adaptabilitatea. Este proprietatea unui bacteriofag de a se adapta, de a deveni activ faţă de o tulpină microbiană, după cultivări repetate în prezenţa acelei tulpini.

Posibilitatea de adaptare a bacteriofagilor este variabilă. În genere, adaptarea se obţine pe specii înrudite şi numai excepţional pe specii îndepărtate. Un exemplu de adaptare depăşind cu mult cadrul speciei este cea obţinută de Hewitt, şi apoi de Ciucă, Popovici, Saragea şi colaboratorii (1958), între fagul stafilococic şi *C. diphtheriae*, şi invers.

Polivalenţa. După cum a arătat însuşi d'Hérelle, spectrul de acţiune al bacteriofagilor, în special al celor intestinali, este foarte întins. Bordet şi Ciucă (1920) demonstrau, de asemenea, la fagul anti-coli un spectru larg, cuprinzînd şi diferite specii de *Salmonella* şi *Shigella*. Această capacitate de a liza numeroase tulpini de specii diferite este cunoscută sub numele de *polivalenţă*, în timp ce caracteristica de a liza în mod specific numai tulpini aparţinînd aceleiaşi specii este desemnată cu termenul de *monovalenţă*. Asupra cauzelor care determină polivalenţa, unii autori au susţinut că fagii polivalenţi sînt în realitate amestec de fagi monovalenţi. Raettig, încercînd să scindeze fagi polivalenţi în fagi monovalenţi, nu a reuşit însă să demonstreze acest mecanism. Acelaşi autor socoteşte că fagii originaţi de tulpini lizogene, au o tendinţă mai pronunţată de a rămîne monovalenţi, pe cînd cei izolaţi din intestin sau din ape poluate au un spectru mai larg. Cercetările lui Ciucă, Combiescu, Nestorescu şi alţii au pus în evidenţă însă tulpini de *Esch. coli* şi *S. paratyphi B*, care manifestau o polilizogenie remarcabilă.

O explicaţie mai conformă a polivalenţei pare a rezida în existenţa unei capacităţi largi de adaptare, pe de o parte, iar pe de alta, a unor arii receptoare comune, printre tulpini de specii diferite.

Rezistența la agenți fizici și chimici. Așa cum s-a arătat încă din cercetările lui Twort, bacteriofagul este un element filtrabil, dovedit ulterior a fi și ultrafiltrabil. Este centrifugabil și ultracentrifugabil

Față de căldură, bacteriofagii se comportă diferit. În unele cazuri, de pildă unele specimene de fagi anti-coli, rezistă la temperaturi mai ridicate decît bacteriile omologe : 75° și chiar 90° (Ciucă, Nestorescu și colaboratorii 1953). În altele, de exemplu fagii antistafilococici, antidifterici, sînt distruși sub 60°. Compoziția chimică a mediului de cultură pare, la rîndul ei, să influențeze susceptibilitatea la căldură a bacteriofagilor. Astfel, Burnet și McKie (1930) au observat fagi mai sensibili la căldură în soluții de sodiu sau potasiu 0,1 N, decît în bulion.

În unele cazuri s-a pus în evidență și fenomenul de termoreactivare similar aceluia observat la unele enzime (Ciucă, Nestorescu și colaboratorii).

Rezistența fagului la bacteriile sporulate este legată de rezistența sporului.

Față de acțiunea frigului, bacteriofagii au o rezistență similară cu a bacteriilor și virusurilor.

La acțiunea razelor ultraviolete reacționează de asemenea similar bacteriilor.

Vibrațiile sonice inactivează fagii, gradul de sensibilitate al acestora variind după specimenele de fagi considerați ; în genere cei cu particule mici sînt mai rezistenți decît aceia cu particule mari.

În genere au sarcină electrică negativă, punctul izoelectric variind după fag (de exemplu, pentru fagul anti-coli la pH 2,9, pentru fagul antistafilococic la pH 3,5).

Sînt adsorbabili pe diferite substanțe : cărbune animal, hidroxid de aluminiu, caolin, fier coloidal, alaun, celulele și țesuturile organismului etc., asemenea coloizilor.

Bacteriofagii sînt de obicei stabili la o scară de pH între 5 și 8, iar la temperaturi joase, chiar între 4 și 9 sau 10.

Față de substanțele chimice reacționează diferit, în raport cu substanța și cu bacteriofagul considerat. Față de detergenți, bacteriofagii sînt mai rezistenți decît bacteriile.

Ureea și uretanul, cu acțiune denaturantă asupra proteinelor și inactivantă asupra enzimelor, inactivează în mod variabil și bacteriofagii ; Burnet (1933) a folosit chiar, ca un criteriu de diferențiere și clasificare a fagilor antidizenterici și anticoli, sensibilitatea lor la inactivarea prin soluții concentrate de uree.

Rezistă la acțiunea timolului, cloroformului, alcoolului etilic, soluțiilor apoase de glicerină. Krestovnikova prezervă fagul cu chinozol 1/10 000. Fenolul 0,25 % de asemenea prezervă fagii. Formaldehida, etanolul, ionul mercur (Sutin), agenții oxidanți, peroxizii, halogenii, ozonul, permanganatul, sărurile metalelor grele etc. inactivează bacteriofagii.

Proprietăți antigenice. Încă din 1920—1921, Bordet și Ciucă au demonstrat antigenicitatea fagului, obținînd, prin administrări repetate la iepure, de preparații fagice, un ser antifag cu acțiune neutralizantă specifică. Serul obținut conține și aglutinine pentru bacteria-gazdă. Aceste aglutinine au putut fi însă îndepărtate prin adsorbție cu bacteriile respective (Otto și Winkler-1921), demonstrînd că fagul era distinct antigenic de bacteria-gazdă. Ulterior s-a sugerat că activitatea anticorpilor antifag nu era limitată numai la neutralizare. Astfel, adăugarea unei suspensii concentrate de particule fagice la antiserul omolog a produs o agregare de corpusculi fagici. Prin ultracentrifugare puteau fi separate din lizatele fagice substanțele solubile posedînd specificitatea antigenică a particulelor fagice (Asheshov, 1925).În contact cu aceste substanțe serul antifag pierde capacitatea de neutralizare. Unele sisteme fag-antifag au capacitatea de a fixa complementul.

Pe de altă parte, vechea concepţie era că fiecare specimen fagic posedă un singur antigen. Lanni şi Lanni (1953), precum şi alţi cercetători, au demonstrat însă ulterior, la fagul T_2, cel puţin două antigene distincte, unul localizat în coadă şi care reacţionează cu anticorpul neutralizant, şi altul localizat la nivelul capului, participînd la agregarea specifică particulelor şi la fixarea complementului, fără a reacţiona cu anticorpul neutralizant.

Cum fagul neutralizat poate fi reactivat prin tratare cu enzime proteolitice, se poate admite că moleculele de anticorp nu distrug fagul, ci interferează mecanic, prin prezenţa lor la suprafaţa fagului.

Prinderea moleculelor de anticorp în anumite locuri la nivelul cozii particulei de fag poate face virusul neinfectant, fie prin prevenirea adsorbţiei, fie interferînd cu injectarea acidului dezoxiribonucleic în bacterie.

După injectarea acidului dezoxiribonucleic, reacţia fag-anticorp rămîne fără efect.

Aplicaţiile fenomenului de bacteriofagie

A. *Aplicaţii în epidemiologie*

Printre numeroasele aplicaţii practice ale fenomenului de bacteriofagie, cele mai importante sînt acele din domeniul epidemiologiei.

1. Comportarea deosebită faţă de diferiţi bacteriofagi a unor tulpini aparţinînd la o aceeaşi specie microbiană a făcut posibilă diferenţierea de tipuri bacteriofagice, printre tulpini care biochimic şi serologic se prezentau întru totul identice.

Bazată pe acest principiu, determinarea tipului fagic (lizotipia) a devenit o metodă de investigaţie larg folosită în epidemiologia unor boli infecţioase, pentru stabilirea sursei de infecţie, oferind posibilitatea de a se urmări originea şi filiaţiunea cazurilor într-un focar epidemic.

Folosind o metodă de lucru accesibilă şi permiţînd recunoaşterea a numeroase tipuri în cadrul aceleiaşi specii, lizotipia şi-a făcut proba eficienţei sale în numeroase episoade epidemice. Tipurile bacteriofagice s-au dovedit stabile, atît prin numeroasele observaţii obţinute la bolnavi şi purtători cît şi pe cale experimentală *in vitro* şi *in vivo*.

Pînă astăzi se foloseşte cu succes lizotipia la S. *typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B*, *S. typhimurium*, pentru care metoda de lucru este standardizată.

De o extindere din ce în ce mai largă pe scară internaţională este astăzi şi lizotipia stafilococilor patogeni, care s-a dovedit utilă în cercetările epidemiologice asupra stafilocociilor cu aspect epidemic.

În sfîrşit, cercetări în vederea stabilirii unor scheme de lizotipie se fac şi pentru alte specii de *Salmonella*, precum şi în domeniul germenilor din grupul *Escherichia* (tipurile serologice incriminate în enteritele infantile), *Shigella* (*flexneri* şi *sonnei*), enterococi, *C. diphtheriae*, *Ps. pyocyanea* etc.

Spectrul de lizosensibilitate a germenilor microbieni fiind influenţat de prezenţa fagilor latenţi, s-a căutat să se folosească, tot în scopul diferenţierii tulpinilor în interiorul speciei, studiul acestor fagi.

Determinarea tipului bacteriofagic prin identificarea fagilor latenţi a fost recomandată mai ales la *S. typhimurium* şi *S. paratyphi B* (Boyd, Scholtens etc.). Este o metodă mai laborioasă, care poate completa în unele cazuri rezultatele obţinute prin lizotipie.

2. O altă aplicaţie practică a fenomenului de bacteriofagie în studiile epidemiologice este folosirea bacteriofagilor ca indicatori ai stării sanitare, ai gradului de impoluare a apelor.

S-a stabilit că apariţia bacteriofagului în apele curgătoare este în strînsă legătură cu starea igienică a regiunilor pe care le traversează. Adaptaţi la flora microbiană bogată a apelor poluate, bacteriofagii izolaţi din aceste ape sînt însă deosebit de polivalenţi şi, prin aceasta, indicaţiile pe care le poate oferi izolarea lor sînt minore. O importanţă epidemiologică semnificativă are numai izolarea bacteriofagilor antitifici „Vi”, capabili să se multiplice numai pe tulpina posedînd antigen „Vi”. Izolarea dintr-o apă a unui fag strict „Vi” poate da indicaţii asupra prezenţei *S. typhi* în acea apă, dat fiind că antigenul „Vi” este rar întîlnit la alte secii microbiene în afara *S. typhi*. În acest fel prezenţa fagului poate da indicaţii valabile în descoperirea originii hidrice şi a căilor de transmitere în epidemii de febră tifoidă. Valabilitatea rezultatelor este însă condiţionată de calitatea tulpinilor indicatoare, folosite pentru izolarea fagilor.

B. *Aplicaţii în scop diagnostic*

În 1954, Cherry, Davis şi colaboratorii au recomandat o metodă de diagnostic al salmonelelor cu ajutorul fagului 0 — 1 (multiplicat pe *S. paratyphi* B, tip I, Felix-Callow). Ulterior şi alţi autori au folosit metoda. La noi în ţară, Combiescu şi colaboratorii (1959), au demonstrat că 95—99% din tulpinile de *Salmonella* sînt sensibile la acest fag, asupra altor enterobacteriacee el fiind doar în mod excepţional activ. Metoda poate fi recomandată ca o completare a diagnosticului serologic.

Folosirea determinării sensibilităţii tulpinilor faţă de fagi specifici în scop diagnostic a început să fie extinsă şi la alte grupe de germeni. Astfel s-a recomandat testul fagic alături de alte metode de diagnostic, pentru diagnosticul diferenţial al *B. anthracis* faţă de *B. cereus* şi *B. mycoides* (McCloy, Brown şi Cherry, Seidel, Ciucă şi colaboratorii).

C. *Aplicaţii în scop terapeutic*

Încă de foarte multă vreme s-a căutat să se folosească în scop terapeutic acţiunea antibacteriană a bacteriofagilor.

Astfel s-a încercat folosirea fagilor prin aplicaţii locale (în leziuni cutanate, infecţii urinare), prin administrări pe cale orală (în infecţii intestinale sau urinare), în unele cazuri chiar pe cale parenterală (de exemplu, cazuri de febră tifoidă, infecţii stafilococice etc.).

În genere, fagoterapia a dat rezultate slabe. Insuccesele tratamentelor cu bacteriofag îşi pot găsi o serie de explicaţii printre care : eliminarea rapidă a fagului din organism, acţiunea fixatoare a ţesuturilor şi elementelor inflamatoare, efectul inhibitor al bilei şi serului sanguin, apariţia de anticorpi antifag, selecţionarea de variante fagorezistente etc.

Rezultatele cele mai bune se obţin prin aplicarea locală a fagului, la nivelul focarului infecţios.

Metode folosite pentru studiul fenomenelor de bacteriofagie

O serie de principii generale, care decurg din caracteristicile bacteriofagilor şi ale bacteriilor-gazdă stau la baza acestor metode. Printre acestea trebuie luate în consideraţie :

— folosirea de culturi tinere în fază de multiplicare activă ;

— medii de cultură potrivite ca reacţie chimică şi conţinut nutritiv, adaptate la cerinţele nutritive specifice culturilor indicatoare şi fagilor respectivi ;

— respectarea cu stricteţe a particularităţilor biologice, şi de rezistenţă a fagilor în studiu, faţă de agenţi fizici şi chimici.

Cercetarea sensibilităţii la bacteriofagi a unei tulpini microbiene

Se efectuează din tulpina de cercetat culturi în bulion de 1—2—3 ore vîrstă, care au fost, la rîndul lor, obţinute prin subcultivarea unor culturi în bulion de 24 de ore.

Ca mediu de cultură se foloseşte mediul gelozat 1,5—2%, pH 7, turnat în plăci Petri. Plăcile cu mediu trebuie păstrate în prealabil 20—24 de ore la 37°, pentru uscare şi controlul sterilităţii.

Însămînţarea culturilor tinere de cercetat se face, fie sub formă de arii rotunde de 1—1,5 cm diametru, cu ajutorul unei anse avînd bucla de 2,75 mm diametru, fie prin răspîndirea culturii în strat uniform pe toată placa şi ridicarea excesului de cultură cu ajutorul unei pipete Pasteur.

Înainte de însămînţare se desenează, pe fundul plăcilor, conturul ariilor pe care urmează să se depună cultura şi fagii, împreună cu indicaţiile acestora.

După însămînţarea culturii, placa este lăsată întredeschisă în apropierea becului de gaz sau la 37°, pînă cînd agarul a absorbit cultura, după care în centrul fiecărei arii se depun preparaţiile fagice (cîte o picătură, cu ajutorul unei anse fine). Plăcile sînt lăsate pe masa de lucru pînă cînd picăturile de fag sînt absorbite de mediul de cultură, după care sînt incubate la termostat cu capacul în jos. Temperatura de incubare, ca şi durata acesteia sînt variabile în raport cu particularităţile de creştere a speciei microbiene de cercetat. Astfel, dacă pentru majoritatea speciilor bacteriene se foloseşte temperatura de 37°, pentru sistemele fago-bacteriene la stafilococ se recomandă incubarea la 30°, iar pentru unele tipuri de *S. typhi* la 38°. În ce priveşte durata de incubare, în cazul speciilor microbiene cu dezvoltare rapidă, este suficient un interval de timp de 5—6 ore, pe cînd altele necesită o incubare de 24 de ore sau chiar mai mult.

Citirea reacţiilor litice se efectuează în raport cu aspectul şi dimensiunile zonelor de liză, după criteriile deja menţionate.

Metode recomandate pentru izolarea bacteriofagilor din produse normale sau patologice

Prezenţa bacteriofagilor poate fi pusă în evidenţă în diferite produse printre care : urină, materii fecale, exsudate purulente etc.

1. **Metoda directă.** Se însămînţează produsul de cercetat în bulion (aproximativ 1 g materii fecale, 1 ml urină, 1 ml exsudat etc., în 30 ml bulion).

După incubare de 18—24 de ore la 37°, lizatul obţinut este filtrat prin filtru de asbest sau de sticlă, iar în absenţa posibilităţilor de filtrare este inactivat prin căldură la baia de apă, 30—60 de minute, la 59—60°. Termoinactivarea poate fi aplicată numai în cazul acelor sisteme fagobacteriene în care fagii sînt mai rezistenţi decît bacteriile omologe, de exemplu *Esch. coli*, *Salmonella* etc. Pentru sistemele fago-bacteriene stafilococice, în care bacteriofagii sînt mai labili decît bacteriile-gazdă, inactivarea prin căldură nu poate fi folosită. Filtratul sau produsul inactivat urmează să fie testat pentru activitatea sa litică faţă de tulpini lizosensibile, bine cunoscute (numite în acest caz tulpini indicatoare). Tulpinile indicatoare test sînt folosite în culturi tinere în bulion, în vîrstă de 1—2—3 ore, metoda de testare fiind identică cu cea expusă mai înainte pentru cercetarea lizosensibilităţii unei tulpini microbiene.

2. **Metoda prin multiplicare.** Această metodă se foloseşte în cazul produselor care conţin cantităţi foarte mici de fag, care nu pot fi puse în evidenţă prin metoda directă.

Principiul metodei constă în adăugarea la bulionul însămînţat cu produsul de cercetat, a cîtorva picături din cultură tînără în bulion, a unei tulpini lizosensibile indicatoare. În rest, tehnica de lucru este identică faţă de cea expusă la metoda directă.

Multiplicarea poate fi monovalentă (cu o singură tulpină) sau polivalentă (amestec de mai multe tulpini indicatoare). De asemenea, poate fi unică, sau repetată de mai multe ori.

Metode folosite pentru izolarea bacteriofagilor din apă

1. **Metoda directă.** Se însămînţează în 30 ml bulion, un volum egal din apa de cercetat. Amestecul este incubat la 37°, timp de 18—24 de ore, după care este filtrat sau, la nevoie, inactivat 60 de minute la 60°. Produsul obţinut este apoi testat pentru prezenţa fagului litic faţă de tulpini indicatoare cunoscute.

2. **Metoda prin multiplicare.** La amestecurile de apă şi bulion, se adaugă cîteva picături din culturi tinere în bulion, preparate cu tulpini indicatoare. Incubarea şi ceilalţi timpi sînt aceiaşi ca în metoda directă.

Multiplicarea poate fi monovalentă (cu o singură tulpină indicatoare) sau polivalentă, unică sau repetată.

În cazul multiplicărilor repetate, produsul poate fi filtrat sau termoinactivat şi apoi testat după fiecare multiplicare în parte, sau se pot face

5—10 multiplicări zilnice, după care se procedează la filtrare sau termoinactivare şi testare faţă de tulpinile indicatoare respective.

O mare atenţie trebuie dată studiului şi selecţionării tulpinilor indicatoare (în raport cu caracterele biochimice, de structură antigenică, de lizosensibilitate, de absenţă a lizogeniei), de calităţile acestora depinzînd în mare măsură eficienţa metodei.

Metode folosite pentru punerea în evidenţă a fagilor elaboraţi de bacteriile lizogene

1. **Metoda directă.** Se cultivă în bulion tulpina de cercetat. După incubare de 24 de ore la 37°, sau de 4—5 ore la 37° şi păstrare peste noapte la frigider, cultura este filtrată sau inactivată 60 de minute la 60°. Produsul obţinut este testat pentru prezenţa fagului, faţă de tulpini indicatoare cunoscute. În cazul fagilor foarte labili faţă de căldură şi care se pierd uşor prin filtrare, se recomandă a se folosi centrifugarea ca mijloc de separare a fagului de elementele bacteriene. În acest caz, după centrifugarea culturii se testează prezenţa fagului în supernatant. Este un procedeu mai puţin traumatizant şi care permite decelarea unor cantităţi reduse de fagi, are însă dezavantajul că preparaţia trebuie testată imediat, neputînd fi păstrată.

O metodă simplă de sterilizare a unor asemenea preparaţii este adăugarea a 0,5 ml cloroform la 10—20 ml de lizat cu agitare energică, după care se lasă să se limpezească şi se îndepărtează cloroformul.

2. **Metoda prin multiplicare.** La cultura în bulion a tulpinii de cercetat se adaugă cîteva picături de cultură tînără în bulion dintr-una sau mai multe tulpini indicatoare (multiplicare monovalentă sau polivalentă)

Multiplicările repetate măresc şansele de izolare a fagilor elaboraţi de tulpinile lizogene.

În rest se procedează întocmai ca la metoda directă.

Metode folosite pentru propagarea unui bacteriofag

1. **Cu ajutorul unei preparaţii fagice în mediu lichid.** Se însămînţează în 100 ml bulion cîteva picături cultură tînără în bulion, dintr-o tulpină lizosensibilă cunoscută, şi se adaugă 4—5 ml din bacteriofagul care trebuie propagat. După incubare de 20—24 de ore la 37° sau 5—6 ore la 37°, şi menţinere peste noapte la +4°, produsul este filtrat. În cazul fagilor specifici enterobacteriaceelor, preparaţia poate fi inactivată 60 de minute la 60°.

Produsul obţinut urmează să fie ulterior testat pentru activitatea lui litică faţă de tulpina indicatoare, care a servit la propagare, după procedeul descris la cercetarea lizosensibilităţii unei tulpini microbiene.

2. **Cu ajutorul ariilor de liză pe mediu solid.** Pe suprafaţa unei plăci cu geloză însămînţată în prealabil cu o tulpină lizosensibilă, se depun 10—12 picături din bacteriofagul care urmează a fi propagat. După incubare de 18—20 de ore (pentru unii fagi sînt suficiente chiar 5—6 ore), cu ajutorul unei spatule de metal flambată şi răcită se ridică ariile de liză, împreună cu o margine de cultură, şi se introduce în 100 ml bulion. După incubare la 37°, produsul este filtrat şi apoi testat, pentru activitatea sa litică faţă de tulpina lizosensibilă pe care a fost propagat.

În cazul cînd bacteriofagul propagat este prea slab, se efectuează una sau mai multe multiplicări, după care se repetă operaţia de filtrare şi de testare.

Titrarea unui bacteriofag

Se efectuează diluţii zecimale în bulion, din bacteriofagul de cercetat schimbînd pipeta la fiecare diluţie. Pe suprafaţa unei plăci cu geloză, însămînţată cu tulpina lizosensibilă omologă, se depune în dreptul ariilor desenate pe fundul plăcii cîte o picătură din fiecare diluţie. După incubare la 37° se citesc reacţiile. Se socoteşte drept titru al bacteriofagului cercetat, ultima diluţie capabilă să producă minimum o plaje.

Colicinele şi alte bacteriocine

Dr. MARCELLA POPOVICI

Definiţie. Colicinele sînt substanţe difuzibile, specifice, produse mai ales de anumite tulpini de enterobacteriacee, capabile să exercite o acţiune bactericidă asupra altor enterobacteriacee, aparţinînd aceleiaşi specii sau la specii diferite.

Istoric. Colicinele au fost descoperite de către Gratia în 1925, cu ocazia izolării prin hemocultură, de la un iepure, a unei culturi virulente de *Esch. coli*, pe care a numit-o *Coli* „*V*" şi al cărei filtrat exercita o acţiune inhibantă asupra altei tulpini de *Esch. coli*, desemnată Coli φ. Tulpina *Coli* „*V*" s-a dovedit capabilă să producă o substanţă activă difuzibilă în agar, filtrabilă, care traversează celofanul, rezistentă la acţiunea căldurii şi a cloroformului, precipitabilă prin acetonă şi aparent neantigenică, pe care a denumit-o „principiul V".

Pe lîngă tulpina Coli φ, principiul „V" s-a arătat capabil să inhibeze şi dezvoltarea unei tulpini de *Sh. dysenteriae*, dar nu şi alte tulpini de *Esch. coli*.

Încă din 1932, Gratia a prezentat un studiu comparativ între această substanţă şi bacteriofagi, descriind unele asemănări şi diferenţe.

Termenul de colicine s-a dat mai tîrziu (Gratia şi Frédéricq, 1946), cînd s-a reluat studiul acestei substanţe inhibitoare, izolîndu-se şi alte substanţe cu acţiune asemănătoare, produse de tulpini de *Esch. coli*. Termenul de colicine trebuie deci să definească substanţe antibiotice produse de *Esch. coli*. Ulterior însă, Frédéricq a izolat substanţe similare de la numeroase tulpini din familia enterobacteriaceelor, aparţinînd genurilor *Escherichia*, *Aerobacter*, *Salmonella*, *Shigella* şi *Proteus* şi care, de asemenea, au fost introduse în grupul colicinelor.

Antibiotice similare au fost descrise la tulpini de *Pseudomonas pyocyanea*, fiind denumite *piocine* (Jacob 1954), precum şi la unele bacterii Gram-pozitive, cunoscute sub numele de *megacine* (Ivanovics şi Alfoldi, 1954).

Descoperirea la mai multe specii de germeni microbieni a unor asemenea substanţe a determinat denumirea mai generală de *bacteriocine*, care cuprinde antibiotice de natură proteică cu acţiune bactericidă asupra unui număr restrîns de specii, acţiune condiţionată de prezenţa unor receptori specifici.

Caracterele şi natura colicinelor

Aşa cum reiese din lucrările unui număr de cercetători (Heatley şi Florey, 1946, Frédéricq, 1948, Jacob, Lwoff, Siminovitch şi Wollman, 1953), colicinele ar fi de natură proteică.

Cercetări mai recente tind să arate o structură mai complexă, probabil glucidolipidoproteică (Goebel, Barry, Miller, 1955).

Sensibile la acţiunea enzimelor proteolitice, diferitele colicine variază între ele ca difuzibilitate, sensibilitate la căldură, pH etc. În raport cu morfologia zonei de inhibiţie, capacitatea de difuzibilitate şi spectrul de acţiune, Frédéricq a diferenţiat 17 grupe deosebite de colicine, pe care le-a desemnat cu litere mari ale alfabetului : A, B, C, D, E etc. Aceeaşi tulpină bacteriană poate produce unul sau mai multe tipuri de colicină. Unele din aceste colicine au fost studiate mai amănunţit. Aşa este cazul colicinei K, cercetată de Goebel şi colaboratorii (1956), care au obţinut-o în stare purificată şi concentrată. Produsul obţinut era termostabil şi, contrar celor semnalate pentru alte colicine, aceasta s-a dovedit antigenică şi asemănătoare, prin caracterele ei chimice, fizice, imunologice şi toxice, cu antigenul „O" al bacteriilor producătoare.

Acţiunea colicinelor este specifică, fiecare colicină avînd un anumit spectru de activitate. Sensibilitatea bacteriilor la colicine pare a fi dependentă de prezenţa unor receptori specifici (Bordet, Beumer, 1948). Într-o populaţie microbiană sensibilă la mai multe colicine diferite pot apărea mutanţi rezistenţi la una sau alta din ele.

Capacitatea de a elabora colicine apare ereditară şi stabilă.

Prin cultivarea mixtă a unei tulpini colicinogene cu una necolicinogenă, se poate efectua transferul capacităţii de a elabora colicina respectivă (Frédéricq). Transferul colicinogeniei pare a fi o consecinţă a conjugării bacteriene.

Bacteriile colicinogenice sînt în general imune la tipul de colicină pe care-l produc.

Modul de acţiune : acţiunea colicinelor asupra bacteriilor constă dintr-un efect letal bactericid, şi nu unul litic. Particula de colicină se fixează pe suprafaţa celulei bacteriene printr-un fenomen de adsorbţie ireversibilă, pe receptorii specifici. Sub acţiunea colicinei, funcţiile de sinteză ale celulei sensibile sînt inhibate, sinteza acizilor ribo- şi dezoxiribonucleici, creşterea bacteriei şi funcţiile respiratorii încetează.

Se pare că o singură particulă letală este suficientă pentru a provoca moartea unei bacterii.

Mecanismul prin care bacteriile colicinogene eliberează particulele letale de colicină a fost mult timp neclar.

Cercetările de inducţie asupra sintezei colicinei la tulpini colicinogenice prin expunere la raze ultraviolete şi raze X, şi alţi agenţi inductori, au permis elucidarea acestui mecanism.

După o perioadă latentă de circa 80 de minute după iradierea cu doze mici de raze ultraviolete, perioadă în care colicina se sintetizează şi se acumulează în celulă, bacteria moare şi liberează colicina în mediu.

În linii generale, aspectele sintezei colicinei induse sînt asemănătoare cu inducţia dezvoltării fagului în bacteriile lizogene.

În mod spontan, probabil, anumiţi indivizi din populaţia microbiană colicinogenă mor şi pun în libertate particulele letale de colicină, care se vor fixa pe bacteriile sensibile.

Metode folosite pentru punerea în evidenţă a acţiunii colicinelor

Printre procedeele de bază se folosesc următoarele:

1. **Metoda striurilor perpendiculare**: pe suprafaţa unei plăci cu geloză se însămînţează tulpina colicinogenă, însămînţarea efectuîndu-se sub forma unui striu lat. După 48 de ore, în care timp placa este păstrată la 37°, perpendicular pe direcţia striului efectuat şi pînă în imediata apropiere a acestuia, se însămînţează, tot în striuri, diferite tulpini cărora li se cercetează sensibilitatea la colicina respectivă. Se incubează apoi placa la 37° timp de 24 de ore, după care se citesc rezultatele. Tulpinile sensibile la acţiunea colicinei vor fi oprite la distanţe variabile de tulpina colicinogenă, în raport cu sensibilitatea lor.

2. **Metoda însămînţării prin înţepătură**: în centrul unei plăci cu geloză se însămînţează prin înţepătură tulpina colicinogenă, astfel încît, după incubare 48 de ore la 37°, să se obţină o colonie mare, de aproximativ 5—7 mm diametru. Această cultură este sterilizată timp de 30 de minute prin vapori de cloroform. Se însămînţează apoi în mod uniform, acoperind toată suprafaţa plăcii (mai puţin suprafaţa coloniei colicinogene) cu tulpina a cărei sensibilitate se cercetează. Această tulpină este cultivată în bulion şi diluată 1/4, înainte de însămînţarea plăcii.

După incubare 24 de ore la 37°, se citeşte rezultatul. Prezenţa unei arii circulare de inhibiţie în jurul coloniei centrale indică acţiunea colicinogenă a acesteia asupra tulpinii cercetate.

Alte bacteriocine

Tulpinile de *Ps. pyocyanea* produc substanţe antibiotice (piocine) cu spectru larg de acţiune. Ele sînt adsorbite în mod specific de tulpinile sensibile care se găsesc numai printre speciile de *Pseudomonas*. Piocinele diferă între ele prin spectrul de acţiune, viteza de difuziune în agar, sensibilitatea la enzimele proteolitice, inductibilitate etc.

Megacinele, elaborate de *B. megaterium*, se arată active nu numai asupra tulpinilor de *B. megaterium*, ci şi asupra altor bacterii, printre care: *B. subtilis*, *B. anthracis*, *Micrococcus aurentiacus*, *Micrococcus cinnabareus* etc.

Relaţiile dintre bacteriocine şi bacteriofagi

Bacteriocinele exercită o acţiune letală, şi nu una litică asupra celulelor sensibile. Atît bacteriocinele, cît şi bacteriofagii virulenţi sînt adsorbiţi pe suprafaţa celulelor sensibile, interferînd cu metabolismul acestora. Spre deosebire însă de bacteriofagi, care se reproduc pe seama celulelor pe care le parazitează, bacteriocinele nu se înmulţesc pe socoteala celulelor pe care le omoară.

Acţiunea bactericidă a bacteriocinelor se epuizează repede prin diluţie şi nu se manifestă niciodată prin plaje izolate. Bacteriocinele sînt mai difuzibile decît bacteriofagii, fiind probabil constituite din particule mai mici. În general, receptorii de bacteriocine sînt independenţi de cei pentru bacteriofagi.

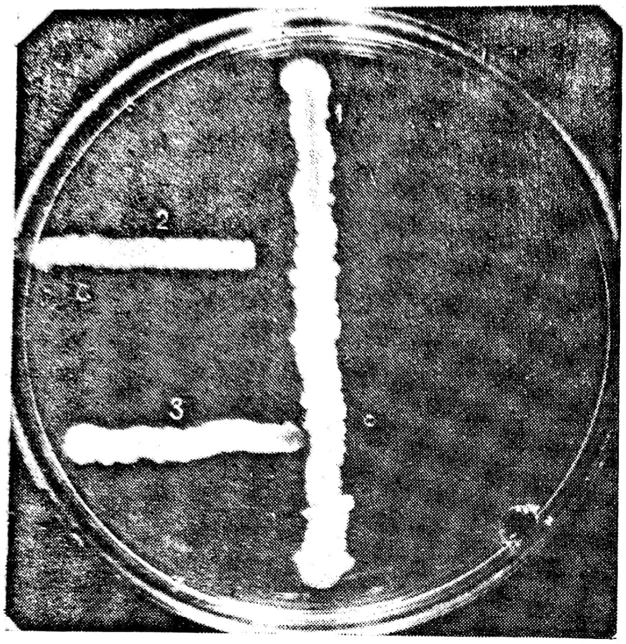


Fig. 55. — Cercetarea acţiunii colicinogene a unei tulpini *Esch. coli* prin metoda striurilor perpendiculare.

1 — tulpină colicinogenă; *2* — tulpină sensibilă; *3* — tulpină insensibilă.

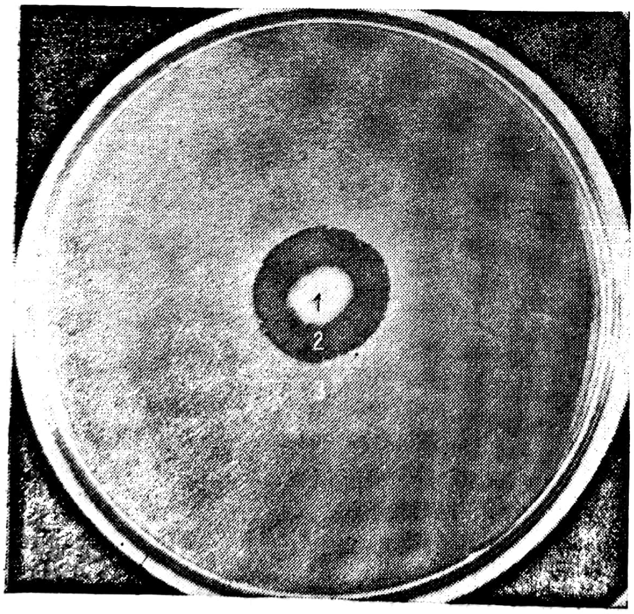


Fig. 56. — Cercetarea acţiunii colicinogene a unei tulpini de *Esch. coli* (metoda însămînţării prin înţepătură).

1 — *Esch. coli* colicinogenă; *2* — zonă de inhibiţie; *3* — *Esch. coli* sensibilă.

Între bacteriocinogenie şi lizogenie există multe asemănări, fără a fi legate una de alta. Ca şi lizogenia, proprietatea bacteriocinogenică se transmite ereditar, imprimă imunitate, se supune acţiunii agenţilor inductori şi poate fi transmisă prin transfer de material genetic.

Din punct de vedere antigenic, nu s-au putut pune în evidenţă nici un fel de relaţii între bacteriofag şi bacteriocine.

Elemente de genetică microbiană

Prof. N. Nestorescu

Ereditatea şi variabilitatea materiei vii, în laturile unităţii lor dialectice, sînt studiate de genetică. Este de la sine înţeles că legile eredităţii şi variabilităţii — legile genetice — sînt aceleaşi pentru întreaga materie vie, ele putînd conferi aspecte particulare, de altfel nesemnificative în esenţa lor, numai în raport cu gradul de organizare şi treapta ei de evoluţie. Ereditatea nu este o proprietate imuabilă, fixă, a materiei vii ; ea se supune legilor generale de dezvoltare, fiind un produs istoric, în care lupta dintre stabilitatea caracterelor şi tendinţa lor de schimbare este permanentă. Această luptă are drept consecinţă apariţia, în mod experimental sau în natură, a indivizilor care prezintă modificări care îi depărtează de exemplarul original, de exemplarul tipic, constituind aşa-numitele mutante.

Virusurile, bacteriile, ciupercile, plantele şi animalele superioare au o capacitate diferită de variabilitate în cadrul selecţiei, în raport cu potenţialul lor mutaţional.

Genetica microbiană a adus deja şi continuă să aducă în patrimoniul geneticii generale cantităţi considerabile de cunoştinţe. S-ar putea spune, fără ezitare, că cercetărilor de genetică întreprinse la nivelul acestei trepte de organizare şi evoluţie se datoresc aproape în totalitate cunoştinţele noastre actuale legate de această ştiinţă. Rolul genetic al ADN şi ARN, genetica moleculară în general, noua concepţie a prezenţei şi funcţionalităţii genelor, cunoştinţele privitoare la teoria informaţiei în biologie, rolul mutaţiei şi al selecţiei ca factori ai evoluţiei, orientarea practică a cercetărilor genetice în vederea ameliorării speciilor în folosul omului etc., aproape toate aceste cunoştinţe au fost puse la îndemînă de cercetările de genetică întreprinse pe microorganisme.

Vom încerca, în cele de mai jos, să descriem cîteva aspecte esenţiale ale geneticii microbiene, pentru a se înţelege mai uşor unele din aspectele clinice şi epidemiologice actuale ale bolilor transmisibile şi chiar ale celor ereditare şi degenerative. Dar, mai înainte de a descrie aceste aspecte, este indispensabil să se scoată în evidenţă deosebirile dintre genetica microbiană şi genetica fiinţelor superioare.

Genetica microbiană se deosebește de genetica ființelor superioare prin două caracteristici :

a) Ca urmare a mutațiilor, mecanism principal al variabilității microbiene, pe de o parte, și datorită haploidiei ca un epifenomen al asexualității lor, pe de altă parte, microorganismele își asigură descendenții numai pe o linie verticală, determinînd ceea ce se numesc *clone*, pe cînd la ființele superioare procesul sexual constînd, în esență, dintr-o fuziune *completă* a două genome provenite de la o celulă masculă și una femelă, dă naștere unui zigot, care este diploid.

În ultima vreme s-a constatat că și printre bacterii există procese care împrumută aspecte de sexualitate asemănătoare ființelor superioare ; printre aceste procese ar trebui enumerate *transformarea, transducția* și *conjugarea* (Adelberg, 1960). Însă, procesele sexuale la bacterii se diferențiază totuși de cele cunoscute la ființele superioare ; pe cînd la ființele superioare la formarea zigotului iau parte *integrală* cele două genome ale celulelor sexuale, la procesele sexuale ale bacteriilor, celula donatoare lasă, de obicei, numai *o parte* din genomul său celulei primitoare.

Se numește *meromixis* fenomenul de transfer parțial genetic care se întîlnește la bacterii și *merozigot* zigotul parțial astfel format (Wollman și Jacob, Hayes, 1956). Se numește *endogenot*, genomul integral al celulei primitoare și *exogenot*, fragmentul parțial al genomului provenit de la celula donatoare (Morse și soții Lederberg, 1956). Exogenotul, în raport cu timpul de contact al celulei primitoare cu celula donatoare, are lungimi variabile. Din această cauză caracterele noi genetice, manifestate la celulele descendente din celula primitoare, sînt diferite, în raport cu numărul unităților funcționale genetice introduse.

b) La bacterii, cromozomul recombinat este mai curînd un cromozom nou în care endogenotul și exogenotul este integrat, pe cînd la zigotul ființelor superioare cromozomul se formează printr-un schimb reciproc de segmente.

Printre factorii care sînt studiați de către genetica bacteriană trebuie enumerați :

Mutanții bacterieni. Cercetările lui Luria și Delbrück, Newcombe și soții Lederberg, au demonstrat că bacteriile ca și organismele superioare, prezintă mutații. Acestea sînt produsul schimburilor în secvența codului genetic care de obicei se întîmplă rar, în mod discontinuu, dar care se păstrează în generații succesive.

Mutațiile pot interesa caractere diferite ale germenilor microbieni : caractere morfologice, biochimice, de metabolism, de rezistență la antibiotice, de structură antigenică etc. Mutațiile pot fi de două feluri : spontane sau induse ; primele apar în natură, în condiții obișnuite de mediu, după un mecanism încă insuficient cunoscut ; cele de al doilea sînt provocate artificial cu ajutorul agenților mutageni care acționează asupra ADN, cum sînt unii agenți fizici, chimici și biologici.

Ca agenți mutageni fizici pot fi reamintiți razele X, razele ionizante (α și β), fascicole de neutroni, razele UV, temperatura etc. Printre agenții mutageni chimici se pot reaminti : inhibitori competitivi ai precursorilor acizilor nucleici (azaserină, benzimidazolul etc.), compuși analogi ai bazelor pirimidinice și purinice (derivați halogenați ai uracilului, derivați aminați ai purinei etc.), acridinele, agenții alkilanți (iperita), acidul nitros, hidroxilamina, formaldehida etc., fiecare din acești agenți acționînd, fie asupra bazelor purinice și pirimidinice, fie asupra scheletului glucido-fosfatic etc.

Ca agenți biologici care pot determina mutații se poate vorbi de antibioticele bacteriene și de unele elemente vii cum sînt de exemplu bacteriofagii temperați care acționează de obicei la nivelul aparatului genetic al bacteriei.

Mutațiile bacteriene sînt cauza variabilității și a evoluției speciilor bacteriene. Tot datorită lor se întîlnesc variații în patogenitatea germenilor sau în caracteristicile de rezistență la chimioterapice etc. Cunoștințele actuale ale posibilității de inducție a mutațiilor îngăduie speranța ca în viitor aceste mutații să poată fi controlate și dirijate în folosul omului.

Punerea în evidență a mutanților bacterieni într-o populație microbiană se face cu ajutorul *markerilor* care sînt caractere genetice, stabile, altele decît cele întîlnite la tulpinile parentale. Markerii pot fi legați de prezența sau absența cililor, capsulei, fimbriei, lizogeniei, de colicinogeneză, de patogenitate etc., sau să scoată în evidență rezistența mutanților la agenți diferiți de mediu (markeri biochimici, markeri de rezistență la antibiotice, markeri auxotrofi (dependenți de un factor de creștere, de obicei un aminoacid, care nu este cerut de restul indivizilor existenți în populația bacteriană a speciei din care ei fac parte) etc.

Recombinanții genetici. Procesele de recombinare la bacterii cunosc 2 feluri de mecanisme : a) unul, cînd materialul genetic exogen se integrează obligator în aparatul cromozomial al bacteriei, dînd loc la fenomenul de transformare și b) cînd materialul genetic (care are proprietăți particulare) nu se integrează obligator în cromozomii bacterieni. După terminologia lui Jacob și Wollman (1958) acest ultim material genetic a primit numele de *episom.*

Transformarea. Transferul proprietăților ereditare, în condiții de transformare *in vivo*, a fost obținut pentru prima oară de Griffith în 1928, care, inoculînd concomitent la șoarece pneumococi vii avirulenți și necapsulați de un anumit tip serologic, cu pneumococi omorîți, virulenți și capsulați de alt tip serologic, a constatat moartea animalelor cauzate de tipul serologic omorît. Trei ani mai tîrziu, Dawson și Sia au obținut aceleași rezultate *in vitro.* Acești autori, cultivînd împreună o tulpină de pneumococi, forma R, împreună cu o tulpină de pneumococi, forma S — omorîtă — la care a mai fost adăugat și ser antipneumococic R, au obținut aceleași rezultate constatate de către Griffith *in vivo.* În sfîrșit, Alloway în 1932 obține același fenomen de transformare, de data aceasta cu extracte acelulare provenite de la o celulă donatoare.

Descoperirea din 1944 a lui Avery, Mc Leod și Mac Carty, privitoare la rolul ADN ca substrat material ereditar al transformării, a făcut obiectul unor cercetări foarte numeroase care au precizat condițiile cerute de acest proces.

Printre aceste condiții trebuie considerate următoarele :

a) eficiența metodei de extracție și de purificare a ADN, care sînt legate de faza de multiplicare a bacteriilor și a posibilității lor de dezintegrare, efectuate totdeauna cu mijloace menajante ;

b) obținerea unui ADN cu o greutate moleculară în jurul $5-8 \times 10^{-6}$ și o concentrație în mediu de $2 \times 10^{-2} - 10^{-3}$ (Zamenhof);

c) mediul de cultură adecvat transformării;

d) tulpinile donatoare și receptoare care trebuie, de regulă, să aparțină aceleiași specii, deși au fost obținute transformări și cu specii heterologe (Pakula).

Referitor la tulpina receptoare folosită trebuie să avem în vedere aptitudinea celulelor de a primi ADN extras din celulele donatoare, adică proprietatea denumită azi starea de competență a celulei primitoare.

Competența culturilor bacteriene față de ADN transformant a fost studiată de mulți autori: Herriot și Goodgal (1956), Schaeffer (1957), Fox și Hotchkiss (1957), Thomas etc. Din datele acestor cercetători reies neîndoielnic următoarele: competența este legată de timpul de contact al ADN cu celula primitoare, de mărimea inoculului, de prezența în mediu a unei cantități de albumină etc.

Competența celulelor primitoare de ADN depinde și se desfășoară în mai multe faze:

1) Legătura între ADN și celulă, care la început este reversibilă dar care ulterior rămîne ireversibilă. În faza ireversibilă o cantitate de ADN pătrunde în celulă. Cantitatea de ADN introdusă și necesară procesului de transformare este evaluată, după Fox, între 80—7200 molecule, după Goodgal, echivalentă cu conținutul în ADN al unei celule donatoare, iar după Lerman cu conținutul a mai multe celule (2—10).

2) A doua fază a transformării este denumită faza de sinapsă. În această fază, ADN transformant suferă un proces de sinapsare în regiunea homologă a materialului genetic al celulei primitoare. După Schaeffer, regiunea imediat alăturată inserării materialului genetic este din punct de vedere funcțional, mai importantă pentru obținerea transformării, decît însuși locul unde se fixează materialul genetic.

3) A treia fază a procesului de transformare o constituie procesul de integrare al ADN introdus, proces bine studiat de către Marmur și Hotchkiss (1956) și Ephrussi-Taylor (1958). În această fază se asistă la formarea unui cromozom complet, prin integrare lineară a materialului introdus, care poartă și markerii noi, mutantul astfel obținut fiind capabil să pună în evidență noua proprietate genetică încă de la prima lui diviziune.

e) Să se recurgă la un presor selectiv în raport cu markerul care diferențiază tulpina parentală de mutant (antibioticul respectiv pentru markerul de rezistență, bacteriofagul litic pentru izolarea mutanților lizogeni etc.).

Mecanismul procesului de transformare este încă rău cunoscut; nici azi nu se știe cum poate pătrunde o moleculă de ADN — polimer înalt — prin peretele și membrana citoplasmică a celulei care, după cum se știe, nu pot fi străbătute decît de compuși cu o greutate moleculară mică. După Hotchkiss, pătrunderea moleculei de ADN nu s-ar putea face decît prin septul de diviziune a celulei în timpul multiplicării. Desfacerea moleculei de ADN, pînă la greutăți moleculare capabile să pătrundă prin formațiile exterioare ale celulei și resinteza lor cu aceeași informație genetică anterior existentă, este greu de admis în condițiile cunoștințelor noastre actuale.

Recombinanţii genetici epizomatici

După Sneath (1962) *epizomii* sînt elemente genetice care pot exista în două stări alternative: ori într-o stare autonomă, citoplasmică, ori într-o stare integrată în cromozomul bacterian. În starea autonomă, episomul se replică independent de cromosomul bacterian şi de obicei mai repede ca acesta; în stare integrată se replică numai o dată cu cromosomul bacterian. Un acelaşi episom poate deveni citoplasmic şi viceversa. Episomii nu sînt indispensabili vieţii bacteriei şi deci ei pot lipsi: dar atunci cînd ei sînt prezenţi în celulă, conferă anumite proprietăţi celulei bacteriene. Substratul material al episomilor este format din ADN.

Episomii cei mai bine cunoscuţi azi sînt: bacteriofagii temperaţi, factorii colicinogenici, factorul F (de fertilitate) şi factorul R (de rezistenţă la antibiotice).

Episomii, fiind formaţi din material genetic exogen, transferă materialul genetic de la o bacterie la alta prin două procese diferite: ori prin transducţie cu ajutorul unui bacteriofag, ori prin conjugarea a două bacterii care, pentru atingerea acestui scop, prezintă anumite particularităţi.

Transducţia. Sub numele de transducţie se înţelege transferul unui fragment din genomul unei celule bacteriene către o altă celulă, cu ajutorul unui fag temperat (Hartman, 1957). Fenomenul de transducţie a fost descoperit de către Zinder şi Lederberg în 1952, folosind un sistem fag-bacterie, în care *S. typhimurium* a servit ca model.

Încă din 1951, Lederberg a arătat că lizatul unei tulpini de *S. typhimurium*, produs prin creşterea unui fag temperat, conţine un agent filtrabil (AF) care poate să transfere markeri genetici de la o tulpină de *S. typhimurium* la alta. Acest autor a identificat AF cu însuşi fagul temperat. Pe de altă parte, Herchey şi Chase au demonstrat că bacteriofagul nu face altceva decît introduce ADN în celulă, cu care ocazie o infectează şi că fenomenul de transducţie este de fapt „incorporarea ADN bacterian cu ajutorul unor particule de fag de la o celulă la alta".

Într-un proces de transducţie se are în vedere totdeauna relaţiile care se stabilesc între genomele bacteriofagului mediator, al celulei donatoare şi al celulei primitoare (transdusă). Aceste relaţii au fost bine precizate de Luria. După acest autor, unele relaţii sînt proprii numai între bacteria transdusă şi fagul mediator, altele se referă deodată atît la bacteria donatoare şi genomul fagic, cît şi la bacteria transdusă.

În cazul relaţiilor stabilite numai între bacteria transdusă şi fagul mediator se pot constata următoarele: dacă bacteria transdusă integrează în genomul său episomii genomului fagic mediator, bacteria transdusă devine lizogenă şi imună, dacă nu îi integrează, bacteria transdusă nu devine nici lizogenă şi nici imună. Prin urmare, transducţia poate exista şi în afara lizogeniei.

În fenomenul de lizogenie, materialul genetic fagic (profagul, fagul latent), de obicei sub forma segmentelor foarte mici, se incorporează în cromozomul bacterian într-un locus specific şi se multiplică concomitent cu acesta, fiind transmis din generaţie în generaţie. Bacteria purtătoare de profag devine lizogenă. Cînd agenţii inductori eliberează profagul din legătura sa cu cromozomul, acesta intră în multiplicare, formînd particule mature care provoacă liza bacteriei. Pe de altă parte, starea de lizogenie este legată şi de starea de imunitate faţă de infecţia supraadăugată cu un fag omolog. Imunitatea bacteriilor lizogene este datorită, după Jacob și Monod (1961) unui proces de represie genetică, care împiedică multiplicarea și maturarea fagului. Represia genetică este datorită unei gene regulatoare cu funcționalitate variabilă.

Dar, în afară de influența pe care o exercită profagul asupra cromozomului bacterian, este de presupus că și bacteria are influență asupra genomului fagic. Cercetările lui Nestorescu N., Popovici M. și Alexenco E. (1962), privitoare la influența bacteriei asupra genomului fagic, au arătat cu prisosință acest lucru. Utilizînd o tulpină de stafilococ nelizogenă și sensibilă la fag (lizotipul 73), care a fost lizogenizată pe rînd cu un număr de 5 fagi antistafilococici cu spectru diferit, față de numeroase tulpini microbiene indicatoare, autorii au arătat că fagii litici elaborați de către celulele lizogenizate aveau același spectru. Aceasta dovedește că integrarea ADN fagic la aparatul cromozomial al bacteriei se face numai pe o anumită zonă, permisă și controlată de celula gazdă, prea strîmtă pentru a primi întreaga masă ereditară a fagului.

Se pare că partea din genomul fagic responsabil de restul spectrului ar muri în momentul sinapsării, deoarece spectrul restrîns al fagilor rămîne neschimbat.

Cînd un profag își pierde capacitatea de a trece în fag litic sub acțiunea agenților inductori din cauza unei activități mai mari a genei represoare, fagul transductor este defectiv, iar bacteriile care poartă un asemenea profag sînt denumite bacterii lizogenic defective.

În cazul relațiilor stabilite între bacteria donatoare, bacteria transdusă și genomul fagic, în procesul transducției se observă uneori și transportul unor fragmente din cromozomul bacteriei donatoare, care pot fi ori integrate în genomul fagic, prin înlocuirea unui fragment din acest genom, ori pot fi numai acționate. În acest caz, bacteria transdusă capătă proprietăți de la bacteria donatoare, care pot trece în expresia fenotipică a celulei transduse.

Un fenomen genetic particular legat de transducție este fenomenul de *conversie*. Ea se poate defini astfel : fenomen genetic care imprimă caracteristici particulare stabile unor bacterii în urma lizogenizării lor.

Autorul care a observat cel dintîi fenomenul de conversie a fost Freeman (1951). Acest autor, tratînd tulpini de *C. diphtheriae*, netoxigene și sensibile la bacteriofagul specific, cu lizatul unei tulpini virulente de *C. diphtheriae*, a obținut celule bacteriene fago-rezistente și toxigene. În 1953, Groman a stabilit că lizogenitatea și toxigenicitatea erau dobîndite deodată de către foarte multe celule bacteriene, ceea ce înlătura ipoteza că tratarea cu fagul difteric a populației microbiene ar avea numai rolul de selecție a mutanților toxigeni prezenți eventual în populația microbiană cercetată.

Barksdale și Pappenheimer au arătat că de fapt toxigenicitatea, este o achiziție a lizogenizării unei populații microbiene sensibile, fenomen pe care l-au denumit conversie.

Un fenomen asemănător a fost descris și la germeni din grupul *Salmonella*, care prin conversie pot căpăta antigene somatice noi.

În opoziție cu transducția care poate folosi un fag transductor defectiv, conversia folosește un fag de obicei normal. Pe de altă parte, transducţia este un eveniment rar, pe cînd conversia se observă frecvent, datorită faptului că mai toate particulele fagice sînt active.

În ţara noastră, fenomenele de conversie a *C. diphtheriae* cu fagi omologi şi heterologi (stafilococi) au fost studiate de către M. Ciucă, N. Nestorescu, A. Saragea, M. Popovici (1958).

Mecanismul după care toxigeneza sau antigenele somatice noi apar o dată cu lizogenizarea nu este cunoscut; s-ar putea totuşi crede că relaţiile care se stabilesc între genomul bacterian şi genomul fagic ar îngădui sinteza unor proteine specifice, care nu ar fi altele decît toxina sau noile antigene somatice etc. (Jacob şi Wollman, 1959).

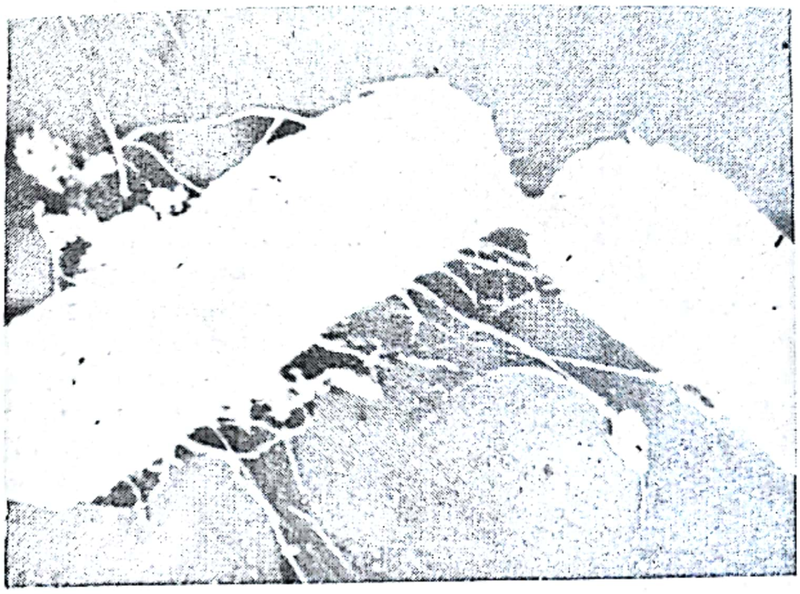


Fig. 57. — Aspecte de conjugare la bacterii (electronografic).

Conjugarea. Cînd transferul materialului genetic de la o celulă bacteriană vie la alta se face nu prin intermediul bacteriofagului, ca în cazul transducţiei, ci direct, printr-o punte citoplasmică care se formează între două celule (fuzionare citoplasmică numită singamie), după care urmează fuzionarea materialului nuclear (numită kariogamie), întregul proces a luat denumirea de conjugare. Conjugarea are ca rezultat final apariţia de recombinanţi. Fenomenul de conjugare a fost observat pentru prima oară de către Lederberg şi Tatum (1946) cu ocazia cercetării genotipurilor existente în culturile mixte auxotrofe (deficitare faţă de trei factori de creştere), pentru a demonstra că şi la bacterii există recombinări.

Pentru aceasta, Lederberg şi Tatum s-au adresat unei tulpini sălbatice de *E. coli* (cunoscută sub numele de *E. coli* K_{12} şi care este menţinută în laboratorul de la Universitatea din Stanford şi la diferiţi mutanţi auxotrofi ai acestei tulpini, obţinuţi cu ajutorul razelor X.

Tulpina de *E. coli* K_{12} sălbatică, nu era dependentă de niciunul din următorii aminoacizi: biotină, fenilalanină, cistină, treonină, leucină şi vitamina B_1 (avea formula: $B^+Ph^+C^+T^+L^+B_1{}^+$).

Printre mutanţii folosiţi, unii erau dependenţi de biotină, fenilalanină şi cistină (mutantul auxotrof $B^-Ph^-C^-$); alţii erau dependenţi numai de treonină, leucină şi vitamina B_1 (mutantul auxotrof $T^-L^-B_1{}^-$).

Cînd au cultivat în cultură mixtă aceşti doi mutanţi auxotrofi, autorii au constatat apariţia de tulpini prototrofe, de formula tulpinii *E. coli* K_{12}, sălbatică. Prin urmare, descendenţii culturii mixte erau recombinaţi genetici.

Pe de altă parte, Hayes (1952) a demonstrat că bacteriile care se conjugă prezintă caracteristici deosebite. Unele din ele — celulele donor — pot fertiliza alte celule — celule receptoare — care sînt incapabile de fertilizare. Celulele care fertilizează sînt cunoscute şi sub numele de celule mascule, celelalte sînt celule femele. Această diferenţă între celulele care se conjugă au primit simboluri : celulele donatoare au fost denumite F^{+}, iar cele receptoare F^{-}.

F^{+}DM -FRF

Cuplajul celulelor $F^{-} \times F^{-}$ dau încrucişate nefertile pe cînd cuplajul celulelor $F^{+} \times F^{-}$ şi $F^{+} \times F^{+}$ sînt fertile.

Celulele fertile deţin unii factori genetici simbolizaţi cu litera majusculă F, inexistenţi la celulele F^{-}. Factorii F trec în timpul conjugării de la celula F^{+} la celula F^{-}. Ei sînt multipli (F^{+}, Hfr, Vfr).

a. *Factorii F* posedă toate funcţiile necesare pentru procesul conjugării, proces care dintre toate formele de sexualitate la bacterii, este cel mai apropiat de cel întîlnit la fiinţele superioare.

Factorii F au caractere de episomi, ei pot fi integraţi în cromozomi sau pot fi autonomi, citoplasmatici. Ca natură chimică, factorii de sex sînt formaţi din ADN (Driskell-Zamenhof, Adelberg, 1963). Caracteristicile factorilor F sînt diferite în raport cu frecvenţa recombinanţilor, cu viteza transformării în urma conjugării unei celule F^{-} în celule F^{+}, cu incorporarea lor în cromozom, cu rezistenţa lor la unele substanţe (clorură de cobalt, acridină etc.), cu orientarea specifică lineară la intrarea cromozomului în celula receptoare etc.

Factorul F^{+} cauzează o frecvenţă joasă de recombinare, are în schimb o putere mare de convertire. Ca urmare a conjugării, el nu pare să fie incorporat în cromozomul bacterian, dar poate fi incorporat cînd se transformă în factorul Hfr. Factorul F intră în celula receptoare fără o orientare specifică lineară fermă. Celulele care conţin factorul F par a fi, după unii autori, numai mutanţi Hfr într-o populaţie microbiană F^{+}.

Factorul Hfr, descoperit de Cavalli-Sforza (1950), oferă o frecvenţă de recombinare extrem de ridicată (sute de ori mai mare ca F^{+}), de aci şi numele său (high frequency of recombination) ; el este incorporat în cromozomul bacterian, iar orientarea lineară a cromozomului este tot lineară, însă cu mult mai fermă decît a factorului F^{+}. Celulele receptoare odată conjugate cu factorul Hfr rămîn mai departe tot celule receptoare. Tratamentul cu acridină şi clorură de cobalt nu alterează factorul Hfr.

Factorul Vhf (very high frequency of recombination), pus în evidenţă de Taylor şi Adelberg (1960), are calitatea, în opoziţie cu factorul Hfr, că transferă cu o frecvenţă mult mai mare markerii terminali ai cromozomului. El este de asemenea incorporat în cromozomul bacterian.

Înainte de a expune fazele conjugării bacteriene care duc la formarea merozigoţilor şi a recombinanţilor genetici bacterieni, este necesar să se arate cum este conceput azi cromozomul bacterian, din punct de vedere al hărţii genetice.

Din datele oferite de Cairns (1962), cromozomul bacterian ar fi format dintr-o simplă moleculă de ADN, care se înfăţişează în cerc închis, formînd răsuciri numeroase, ca o jurubiță, pentru a ocupa un spațiu cît mai mic în celula bacteriană. De altfel, pe date privind frecvența recombinărilor și a stabilirii hărții cromozomale, Jacob și Wollman sugerau, încă din 1958, că cromozomul bacterian se înfățișează ca un cerc închis, cel puțin în celulele bacteriene ale tulpinii de *E. coli* K_{12}, cu care acești autori lucraseră.

Pe acest cerc cromozomal, genele, răspunzătoare de diferitele sinteze, se succed una după alta (vezi fig. 58). Dacă cromozomul, în vederea conjugării, se rupe într-un punct oarecare, capătul care intră primul în celula receptoare a primit simbolul O (origina). Toate genele subiacente

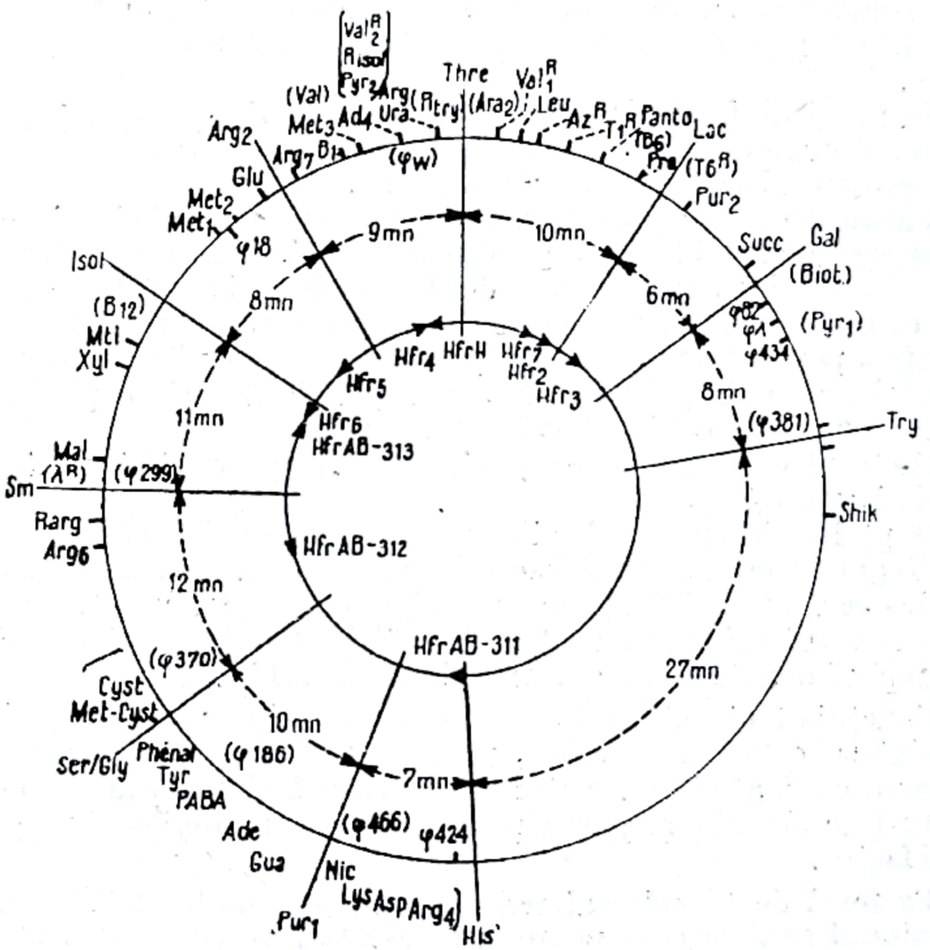

Val_2^R
R isol
Pyr_3
(Val)
Arg
(R try)
Thre
Val_1^R
(Ara2)
Leu
Az^R
$T1^R$
Panto
(T6)
Lac
Met3
Ad4
Ura
Arg2
Arg7
B1
(φW)
Pro
(T6R)
Pur2
Glu
Met2
Met1
φ18
9mn
10mn
Succ
Gal
(Biot.)
Isol
(B12)
Mtl
Xyl
8mn
6mn
φ82
φ1
φ434
(Pyr1)
Hfr4
HfrH
Hfr7
Hfr2
Hfr3
Hfr5
Hfr6
HfrAB-313
11mn
8mn
(φ381)
Try
Mal
(λR)
(φ299)
Sm
Rarg
Arg6
HfrAB-312
Shik
12 mn
HfrAB-311
(φ370)
27mn
Cyst
Met-Cyst
10 mn
Ser/Gly
Phenal
Tyr
PABA
(φ 186)
7mn
Ade
Gua
(φ466)
φ424
Nic
Lys Asp Arg4
Pur1
His

Fig. 58. — Reprezentare schematică a grupului de lineaj (unire) al lui E. Coli K. 12. Linia exterioară reprezintă ordinea caracterelor (nu distanțele lor absolute). Liniile punctate reprezintă intervalele de timp de pătrundere între perechi de markeri corespunzători — liniile radiare. Linia interioară reprezintă ordinea de transfer a diferitelor tipuri de Hfr descrise în figura 26. Fiecare săgeată corespunde originii tulp. Hfr. corespunzătoare.

Simbolurile corespund sintezei treoninei (Thre), leucinei (Leu), pantotenatului (Panto), prolinei (Pro), purinelor (Pur), biotinei (Biot), pirimidinelor (Pyr), triptofanului (Try), acidului shikinic (Shik), histidinei (His), argininei (Arg), lizinei (Lys), nicotinamidei (Nic), guaninei (Gua), adeninei (Ade), acidului paraaminobenzoic (PABA), tirozinei (Tyr), fenilalaninei (Phenal), glicinei (Gly), Serinei (Ser), Cisteinei (Cyst), metioninei (Met), vitaminei B_{12} (B_{12}), izoleucina (isol), thiaminei (B_1), valinei (Val); fermentării arabinozei (Ara), lactozei (Lac), galactozei (Gal), maltozei (Mal), xilozei (Xyl), manitolului (Mtl); cerința de succinat (Succ), aspartat (Asp.), glutamat (Glu); rezistența la valină (Val^R), la azid de sodiu (Az^r), la fagii T_1 (T_1^r) T_6 (T_6^r); reprimare represia pentru arginină (R arg), izoleucină (R isol), triptofan (R try), localizarea profagilor inductibili 82, 434, 381, 21, 424, 466 și a profagilor neinductibili 186, 370, 299, 18 și W. Simbolurile în paranteze indică faptul că localizarea markerului în ceea ce privește markerii vecini nu a fost exact determinată.

Cifrele date pentru intervalele de timp între doi markeri corespund mediei a mai multor experiențe de conjugare întreruptă utilizînd tulpini Hfr. care injectează precoce regiunea implicată.

capătului O se succed totdeauna în aceeaşi ordine. Pe de altă parte, în raport cu durata rezervată penetraţiei cromozomului şi cu a particularităţilor pe care le împrumută factorii de sex, merozigoţii vor primi mai multe sau mai puţine gene din fragmentul de cromozomi introdus şi prin urmare, se vor pune în evidenţă, după caz, mai mulţi sau mai puţini markeri.

Astăzi se lucrează mult pentru obţinerea a diferiţi mutanţi Hfr şi stabilirea hărţilor lor genetice.

În ţara noastră, A. Săsărman şi T. Horodniceanu, lucrînd cu o tulpină de *E. coli* K_{12}—Hfr pe care au conjugat-o cu un mutant de *E. coli* care prezenta multe caractere de dependenţă, au putut fixa pe cromozom locusul care determină dimensiunile coloniilor, pe care autorii l-au propus să fie simbolizat cu denumirea „Dim". Determinantul Dim, care este aşezat distal faţă de O, are strînsă legătură cu locusurile arabinoză şi cisteină.

În afară de factorii F, se mai pot transmite prin conjugare şi alte episome. Printre acestea sînt de considerat factorul colicinogen (factorul „Col") şi factorul de rezistenţă (factorul R).

Factorul colicinogen este un determinant genetic, citoplasmatic care în opoziţie cu factorul F, se transmite de la o celulă la alta, în cîteva minute. Datorită acestei viteze mărite de transmisie, factorul colicinogen nu numai că se transmite uşor în generaţii succesive, dar el poate să se transmită într-o populaţie microbiană pe cale de multiplicare de la o celulă la alta, chiar în timpul ratei de generaţie. Transmisia capătă un aspect de difuziune dintre cele mai evidente.

Factorul colicinogen, ca şi alţi factori episomatici, poate fi transmis şi de bacteriofagi.

După Beföldi, factorul colicinogen, ca orice episom de altfel, se poate şi el integra în cromozomul bacteriei primitoare, cu care ocazie, ca şi o celulă lizogenizată sub influenţa unui bacteriofag temperat, devine imună faţă de factorul colicinogen integral. În această situaţie, factorul colicinogen se replică o dată cu cromozomul bacterian (Hfr.Col).

Funcţiile factorului colicinogen sînt multiple : se autoreplică, determină sinteza colicinei specifice, prepară transformările peretelui celular în vederea conjugării etc. Natura chimică a factorului „Col" este ADN ; nu pare improbabilă şi participarea ARN la acţiunile diverse atribuite acestui factor.

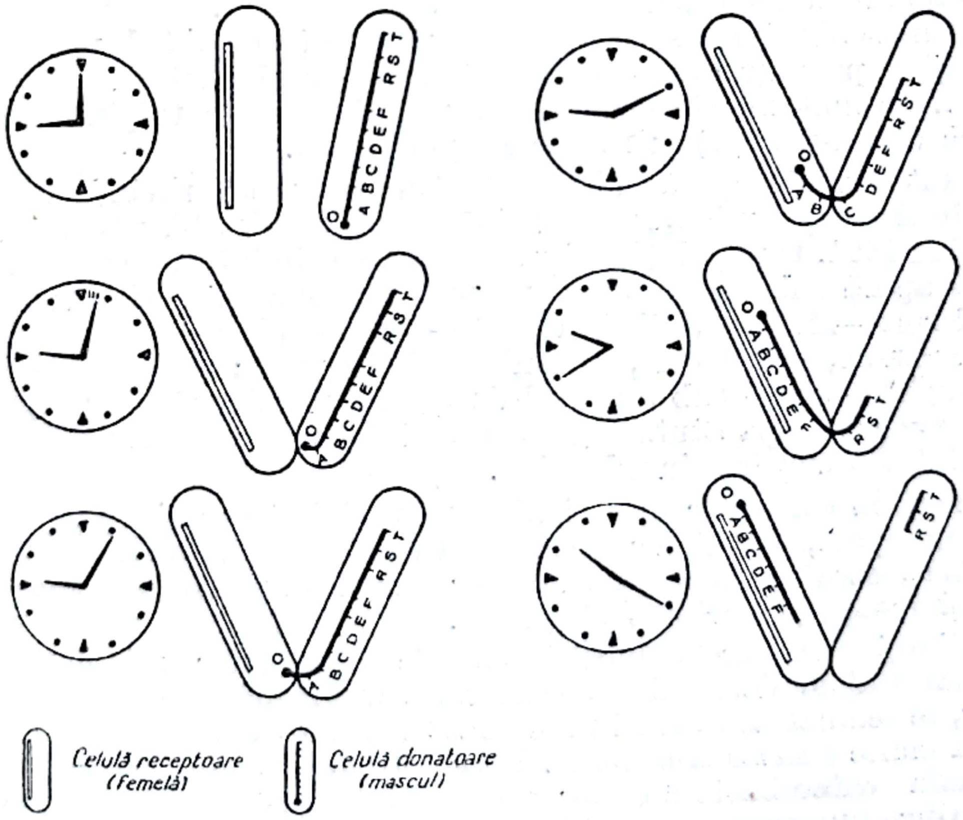
Factorul de transfer al rezistenţei la antibiotice (RTF) este format din material genetic care poate fi transmis prin conjugare. Cunoştinţele actuale asupra RTF se datoresc în majoritate autorilor japonezi (Watanabe, Kondo, Mittsuhashi, Fukasawa etc. (1958—1964). Factorul de transfer al rezistenţei, el singur, nu determină rezistenţa la antibiotice, ci numai organizează şi transferă un segment genetic capabil să determine rezistenţa la antibiotice. Cuplul RTF, împreună cu segmentul genetic capabil să determine rezistenţa la antibiotice, a primit numele de factorul R (Watanabe). Ambele formaţiuni ale cuplului se comportă ca episomi. Integrarea lor în cromozomi poate să determine aspecte asemănătoare celor arătate în cazul factorilor F (în care caz denumirea este Hfr T). După autorii japonezi, natura chimică a factorului R este tot ADN. Funcţia factorului R pare să rezide în acţiunea lui asupra membranei celulelor bacteriene receptoare.

Conjugarea bacteriană are, după Jacob și Wollman, două stadii succesive:

a) formarea zigoților și b) formarea recombinanților.

a) Zigotul se formează datorită particularităților existente atît la celulele donatoare cît și a celor primitoare, pe care le controlează totdeauna factorii de sex F (zonă receptoare, natură chimică, prezență de antigene de suprafață etc.). Mobilizarea și ruperea cromozomului se fac cu ajutorul unui sistem enzimatic și cu suficientă energie pe care le pun la îndemînă celula masculă Hfr. Formarea zigotului se efectuează după o împerechere efectivă a celulei donatoare cu cea receptoare (puntea citoplasmatică) și transferul materialului genetic determină cu această ocazie ca celula femelă să devină, cel mai adesea, incomplet și temporar, diploidă. În timpul transferului, factorul F poate trece în celula receptoare și alt material, fie că acesta este sau nu genetic;

b) formarea recombinanților este pusă în evidență prin integrarea materialului genetic de la celula masculă la celula femelă (prezența de markeri masculi) și transmisia lui recombinanților, după legile segregării. Transferul materialului genetic durează aproximativ 120 minute, pe cînd integrarea lui Micromozom se face într-un timp scurt (10—40 minute) (vezi schema de mai jos).



SEXUALITATEA LA BACTERII

În ceea ce privește problema variabilității la bacterii, episomii, ca și transferul parțial sau total de cromozom, joacă un rol important. Aceste formații genetice, prin structura, funcția, natura chimică și mai ales mecanismul lor de difuziune, par să depăşească mult limitele speciilor, genurilor şi chiar ale familiilor de care aparţin diverşii germeni microbieni.

Dacă am reaminti numai că diferiţi autori au realizat deja transferul de material genetic *in vitro* între germenii aparţinînd genurilor *Escherichia* şi *Shigella*, între *Escherichia* şi *Salmonella*, ca şi între *Escherichia* şi *Serratia*, cît şi transferul aceluiaşi material *in vitro*, s-ar putea cel mai bine scoate în evidenţă rolul pe care îl joacă aceste fenomene genetice în variabilitatea germenilor microbieni patogeni, fenomen cu adînci repercusiuni în domeniile bolilor transmisibile, imunităţii, clinicii şi epidemiologiei.

Faptele de observaţie, puse în evidenţă prin cercetări experimentale, pe de o parte, ca şi cele puse în evidenţă cu ocazia studierii clinice şi epidemiologice a bolilor transmisibile, pe de alta, au scos la iveală o lege generală, şi anume că fenomenele de variaţie microbiană pot afecta oricare din caracterele esenţiale ale germenilor microbieni.

1. Privitor la *caracterele morfologice* sînt semnalate numeroase variante; astfel *S. typhi* O_{901} este aciliată, deşi *S. typhi* este un germen ciliat tipic. În mod experimental, Condrea a obţinut variante aciliate la *Cl. tetani*, iar Nestorescu, sub acţiunea tripaflavinei, la *Cl. septicum*.

Pasteur, cultivînd *B. anthracis* la temperaturi ridicate (42—43°), a obţinut o variantă asporulată; acelaşi lucru l-a obţinut Roux prin supunerea aceluiaşi germen la acţiunea antisepticelor.

Se cunosc, de asemenea, variante acapsulate (spre pildă la pneumococ).

2. Şi în privinţa *caracterelor tinctoriale* s-au obţinut unele variante: Klimek a obţinut un stafilococ gram-negativ dintr-o tulpină tipică de stafilococ (gram-pozitiv) sub acţiunea penicilinei.

3. Cît priveşte *caracterele de cultură* acestea pot varia în limite largi; este des întîlnit, spre pildă, fenomenul de disociere microbiană descoperit de de Kruif în 1921. O populaţie microbiană care este totdeauna neomogenă, poate să apară sub mai multe aspecte morfologice de colonii; una din aceste forme — forma „S" (smooth) — apare sub aspectul de colonii bombate netede, translucide, cu contur tăiat regulat; altă formă — forma „R" (rough) — apare sub aspectul de colonii turtite, zbîrcite, opace, cu contur crenelat. După Stutzer şi alţi cercetători, caracterele formelor „S" şi „R" sînt cele cuprinse în tabelul V.

În afara coloniilor „S" şi „R" au mai fost descrise colonii „M", cu aspect mucos, sidefii, vîscoase, greu emulsionabile, sau chiar colonii „G" pitice, care în prezenţa anumitor săruri minerale (sulfit de sodiu) pot să-şi recapete mărimea obişnuită.

4. Deşi caracterele biochimice ale germenilor microbieni sînt mult mai stabile decît alte caractere, care istoriceşte sînt dobîndite ulterior, se semnalează totuşi numeroase variante care pot interesa unul sau mai multe *sisteme biochimice*. Dacă s-ar referi, cu precădere, numai la familia enterobacteriaceelor patogene sau condiţionat patogene, s-ar întîlni numeroase tulpini de germeni—aşa-numitele tulpini de graniţă a germenilor aparţinînd acestei familii—care posedă unul sau mai multe caractere biochimice modificate, în afară de cele care variază în interiorul aceleiaşi specii.

Încă din 1906, Neisser, Massini etc. semnalează tulpini de *Esch. coli* care nu fermentau lactoza, după cum alţi autori au întîlnit tulpini

Tabelul V

Forma „S"	Forma „R"
Bulionul cultivat este tulburat omogen	Bulionul cultivat prezintă sediment
Suspensia este omogenă și stabilă în ser fiziologic	Suspensia nu este omogenă și depune în ser fiziologic
Nu sînt aglutinate în soluția de tripaflavină.	Aglutinează în soluția de tripaflavină
Creșterea pe geloză este omogenă și umedă	Creșterea pe geloză este neomogenă și uscată
Coloniile sînt netede, cu margini tăiate drept	Coloniile sînt zbîrcite, margini neegale, plate
Coloniile formează colonii-fiice	Formează foarte rar colonii-fiice
La speciile capsulate, capsula se dezvoltă bine	Capsula nu se dezvoltă (acapsulată)
Posedă o structură antigenică completă	Lipsesc unele antigene ; de obicei antigenul O este degradat (∅)
Conțin un polizaharid specific	Nu conțin polizaharidul specific
La speciile patogene, cu unele excepții, constituie stadiul virulent	Sînt slab virulente sau avirulente
Se izolează în forme cilinice acute	Se izolează mai des la forme cronice și purtători
Sensibilitate marcată la bacteriofag	Mai puțin sensibilă la bacteriofag
În ser specific, anti-S, se transformă în forma „R"	Nu suferă modificări importante
Nu disociază în ser anti-R	Disociază în ser anti-R
Nu este sau este slab fagocitat	Este ușor fagocitat

de enterobacterii care fermentau lactoza și care provocau febră tifoidă tipică. Se știe, de asemenea, că se întîlnesc numeroase variante de *S. anatum* care fermentează lactoza, specia tip fiind lactoză-negativ ; exemplele pot fi date și pentru alte specii : astfel *S. typhi suis* nu fermentează manitolul ; au fost totuși întîlnite mutante care îl fermentează. Se știe că salmonelele nu produc indol ; se întîlnesc însă mutante de *S. eastbourne* care sînt indologene etc. Nestorescu și Popovici au obținut modificări fermentative sub influența bacteriofagului.

5. O serie de mutante microbiene, semnalate încă de la începutul chimioterapiei (Ehrlich, 1907) sînt mutantele *rezistente sau dependente* la *chimioterapice* și în special *la antibiotice*. Rezistența germenilor poate fi obținută *in vivo* sau *in vitro* față de unul sau mai multe chimioterapice cu care ocazie se observă modificări ale germenilor care nu sînt limitate numai la un singur caracter. Metodele de obținere a mutantelor rezistente diferă, după cum ne adresăm unuia sau altuia dintre chimioterapice, după cum repetăm sau nu expunerea germenilor în prezența aceluiași chimioterapic sau facem o expunere continuă etc.

6. Mutantele microbiene foarte des întîlnite sînt în cadrul *structurii antigenice* a germenilor microbieni. Se știe că familia enterobacteriaceelor este formată din grupuri biochimice, ultimele fiind formate din specii care se pot diferenția pe baza structurii lor antigenice. Cu toată stabilitatea biochimică pe care o prezintă un asemenea grup, mutantele antigenice sînt atît de numeroase, încît un capitol special de studiu se ocupă numai de relațiile antigenice strînse existente la aceste grupuri.

Am enumerat numai cîteva: relaţii antigenice între *Salmonella*, *Arizona* şi *Escherichia*; relaţii antigenice între *Shigella* şi *Escherichia*; între *Proteus* şi *Escherichia*, între *Proteus* şi *Providencia*. Toate aceste relaţii sînt expresia unor întinse fenomene de mutaţie, care se întîlnesc în natură sub influenţa diferiţilor factori care influenţează profund masa ereditară a germenilor şi care duc la mari dificultăţi de identificare a acestora.

Dar în afară de mutante de germeni care au relaţii foarte îndepărtate interspecifice, se întîlnesc numeroase mutante serologice intraspecifice. Să luăm cazul *S. typhi*: acest germen microbian are un antigen ciliar („H”), un antigen de suprafaţă („Vi”) şi un antigen somatic („O”). Aceste antigene intraspecifice pot suferi schimbări profunde, care sînt, de fapt, expresia manifestărilor substanţei ereditare a variantelor modificate. Astfel, antigenul „H” poate suferi variaţie de fază, antigenul „Vi” poate suferi o variaţie cantitativă, iar antigenul „O” poate suferi profunde modificări chimice, cu pierderea hidrocarbonatului specific. Chiar apartenenţa fagică diferită a numeroaselor tulpini aparţinînd serologic aceleiaşi specii este datorită tot masei ereditare a germenilor, care este influenţată de prezenţa profagului în interiorul celulei bacteriene; în sprijinul acestei opinii pot fi aduse lucrările lui Anderson, care a dovedit că apartenenţa fagică a unor tulpini de *S. typhi* este imprimată de prezenţa bacteriofagilor de tip în interiorul celulei-gazdă.

7. Numeroase mutante microbiene sînt întîlnite în *complexul caracterelor de patogenitate*:

Mutante de virulenţă a germenilor patogeni sînt întîlnite la tot pasul. Este cunoscută tulpina atenuată B. C. G., obţinută experimental de către Calmette şi Guérin, după treceri numeroase pe medii biliate a unei tulpini virulente de *Mycobacterium tuberculosis* de tip bovin. Sînt cunoscute, de asemenea, mutante complet avirulente, obţinute sub influenţe diverse, cum este *P. tularensis* sau *P. pestis*, mutante care pot folosi ca vaccinuri vii pentru imunizarea animalelor, şi, eventual, a omului.

O variaţie microbiană extrem de întinsă se întîlneşte la vibrionii holerici. Aceşti germeni pot fi întîlniţi în aceeaşi epidemie, la diverşi bolnavi şi în aceeaşi ansă intestinală chiar, într-o gamă întinsă de grade de virulenţă: de forme complet avirulente şi atoxice, la forme virulente şi hipertoxice.De altfel virulenţa unui germen fiind un atribut de tulpină, este explicabil de ce fenomenul de variaţie este extrem de întins.

Mutante de *toxigeneză* sînt de asemenea întîlnite. Se cunosc mutante de *C. diphtheriae*, a cărui toxigeneză, aşa cum au arătat pentru prima oară Freeman, Groman şi Hewitt, este legată exclusiv de prezenţa fagului temperat în celula bacteriană, ca şi variantele atoxigene de *C. diphtheriae*, care sînt lipsite de caracterul lizogen. Se cunosc, de asemenea, potenţialitatea toxigenă crescută a *Cl. welchii* a cărei toxină de bază—componenta α—este asociată cu hialuronidaze sau colagenaze care pot fi sau nu prezente la o tulpină microbiană dată, ca şi toxigeneza crescută a tulpinii de stafilococ cunoscute sub numele de tulpina „Wood”.

8. În fine există şi mutante de *imunogenitate*. Deşi unele tulpini prezintă proprietăţi morfologice, biochimice, de structură antigenică,

similare cu alte tulpini aparținînd aceleiași specii, au o putere imunogenă crescută, fie pentru animale de laborator, fie pentru om, fie pentru amîndouă aceste categorii de ființe. Aceste tulpini sînt foarte prețioase pentru prepararea de vaccinuri, ele fiind selecționate și conservate sub formă liofilizată.

9. Deseori, modificările semnalate mai sus se manifestă față de tulpina tipică, cu *proprietăți schimbate în complex cu modificări corelate.* Astfel, o tulpină microbiană poate, sub influența bacteriofagului specific, să devină modificată în caracterul său fermentativ, structura sa antigenică și caracterul său de lizogenitate (Nestorescu și Popovici); de asemenea, chiar sub influența unor bacteriofagi heterologi, s-au putut obține modificări esențiale în forma, caracterele biochimice, de structură antigenică și caractere de lizogenitate, pînă la pierderea caracterelor esențiale ale tulpinii de origine și cîștigarea caracterelor esențiale heterologe (Ciucă, Nestorescu, Popovici).

Cunoștințele actuale asupra variabilității microbiene nu se rezumă numai la probleme privind genetica microbiană ca o disciplină ce tinde să devină de sine stătătoare; aceste cunoștințe pot să explice unele mecanisme care intervin în procese particulare clinice și epidemiologice ale bolilor transmisibile, altă dată neînțelese.

Dacă ne-am rezuma numai la aspectele noi ale patologiei pe care o impune practicarea antibioterapiei, care duce la rezistența germenilor, pe de o parte, sau la aspectele grave pe care le pot împrumuta uneori valurile epidemice, pe de altă parte, și încă ar fi de ajuns să înțelegem rolul și importanța variabilității microbiene în practica medicală.

Cîteva exemple ar fi instructive. Se știe că în rino-faringe sînt mai totdeauna prezente tulpini de stafilococ, lizogene, sau fagi stafilococici liberi care au capacitatea de a lizogeniza tulpini de *C. diphtheriae* care devin foarte toxigene. Cercetări în acest sens au fost făcute și în țara noastră (Ciucă și colaboratorii).

Se presupune că un fenomen analog se petrece și în natură. Este admis azi că lizogenizarea *C. diphtheriae*, sub acțiunea fagului omolog sau heterolog produce cazuri clinice și valuri epidemice de difterie dintre cele mai grave (Ciucă, Nestorescu, Saragea, Popovici).

Și cazuri inverse sînt posibile, cînd stafilococi sensibili și nelizogeni pot fi lizogenizați de către fagi difterici, imprimînd acestor tulpini microbiene caractere noi, legate de lizogenizare (Ciucă, Nestorescu, Popovici, Saragea, Alexenco).

Cazuri de acest fel pot fi enumerate și datorită practicării antibioterapiei. S-au cunoscut schimbări importante de virulență a germenilor rezistenți la antibiotice sau apariția mai frecventă a unor anumite boli (candidoze) ca urmare a folosirii acestor substanțe. Fără îndoială că aceste aspecte noi în patologie nu sînt legate numai de disbacteriozele imprimate de antibiotice, ci și de mutantele microbiene care apar sub influența lor.

Biologia, patologia şi folosirea animalelor de laborator

Dr. Viorica Andreescu

Animalele domestice sau sălbatice care se folosesc în experimentările biologice poartă denumirea de animale de laborator.

Date biologice asupra unor specii de animale de laborator

Iepurele

(Oryctolagus cuniculus)

Iepurele, folosit frecvent în laboratoarele de cercetări biologice, face parte din Ordinul rozătoarelor.

În cadrul acestei specii animale sînt descrise mai multe rase.

— Iepurele de Chinchilla, denumit astfel din cauza asemănării culorii blănii sale cu a rozătorului sălbatic „Chinchilla", din America de Sud. Firul de păr prezintă o coloraţie inegală : la rădăcină este colorat în albastru, în partea mijlocie este alb, iar la suprafaţă este negru; perii din jurul ochilor sînt de culoare cenuşiu deschis, iar cei de pe abdomen, părţile interne ale coapselor şi partea terminală a cozii sînt de culoare albă, cu reflexe albăstrui.

— Iepurele de Champagne, rar utilizat ca animal de experienţă, are o culoare argintie caracteristică; perii, la naştere, sînt de culoare neagră; la vîrsta de 4—6 luni capătă culoarea albăstruie.

— Iepurele de Flandra, sau „uriaşul belgian", se deosebeşte de celelalte rase prin greutatea sa, care poate atinge 9 kg. Blana sa este de culoare cenuşiu închis sau neagră.

— Iepurele albastru vienez are o culoare cenuşie-albăstruie.

— Iepurele de Havana are blana de culoarea ţigărilor de Havana, spatele fiind mai intens colorat.

— Iepurele de Alaska are blana uniform colorată în negru.

— Iepurele comun, de diferite culori, este cel mai frecvent folosit în laborator, fiind mai ieftin decît cei de rasă pură.

Iepurele este apt de fecundare de la vîrsta de 4 luni; totuşi, în crescătorii, pentru a obţine exemplare cît mai viguroase, se folosesc ca reproducători femele de 7—8 luni şi masculi de 12 luni; în genere, un mascul poate fecunda 12 femele.

Durata perioadei de gestaţie este 30—35 de zile; o femelă poate duce 3 gestaţii pe an.

Iepuroaica plină trebuie izolată singură, în cuşcă, într-un loc întunecos; către sfîrşitul perioadei de gestaţie îşi pregăteşte culcuşul cu perii pe care şi-i smulge de pe pielea abdomenului şi cu fragmente de furaje pe care le fărîmiţează cu dinţii.

Femela dă naştere, de fiecare dată, la 3—10 pui, pe care îi alăptează 30 de zile; puii, la naştere, au ochii închişi şi corpul acoperit cu peri, vizibili numai cu lupa.

În timpul perioadei de alăptare, iepuroaica trebuie să primească o raţie alimentară mai mare şi o cantitate suficientă de apă. Iepuroaica subalimentată sau deshidratată îşi mănîncă puii sau nu-i mai alăptează.

Puii încep să vadă clar la 7—10 zile după naştere, iar la 30 de zile încep să mănînce iarbă, încît pot fi separaţi de mamă.

Greutatea iepurilor după vîrstă

1 lună	500 g	5 luni	2 100 g
2 luni	700 g	6 luni	3 000 g
3 luni	1 050 g	7 luni	3 400 g
4 luni	1 400 g	8 luni	3 800 g
		9 luni	4 400 g

Durata vieţii unui iepure este de 7—8 ani.

Cobaiul

(Cavia porcellus L)

Cobaiul, animal blînd, uşor de manipulat, face parte, ca şi iepurele, din Ordinul rozătoarelor. Cobaii se împart în 3 grupuri:

1. Cobaii cu părul scurt.
2. Cobaii cu părul lung.
3. Cobaii cu părul aspru, zbîrlit.

1. În experienţele de laborator se utilizează, în mod frecvent, cobaii cu părul scurt; aceştia se împart, după culoarea părului, în următoarele varietăţi:

— Cobaii de Olanda, care au jumătatea anterioară a corpului de culoare albă, iar jumătatea posterioară roşcată, neagră sau albăstruie.

— Cobaii Aguti, cu cele două varietăţi:

a) auriu, cu abdomenul roşcat;
b) cenuşiu, cu abdomenul argintiu.

— Cobaii Himalaia sînt albi, cu nasul, urechile şi picioarele negre.

— Varietatea de cobai „broasca ţestoasă” cu pete negre, roşcate şi albe, situate simetric pe flancuri.

— Cobaii obişnuiţi au perii scurţi, coloraţi inegal, în una, două sau trei culori : alb, negru sau roşcat. Cobaii albi sînt mai puţin rezistenţi decît cei coloraţi.

2. Cobaii cu părul lung, sau cobaii de Angora, sau cobaii peruvieni au perii foarte lungi, încît acoperă complet capul şi picioarele ; fiind foarte sensibili la frig şi umezeală, nu se utilizează în practica de laborator.

3. Cobaii cu părul aspru, zbîrlit, au perii aşezaţi în formă de rozetă ; fiind foarte receptivi la diverse boli, nu se utilizează în practica de laborator.

Maturitatea sexuală a cobaiului începe de la vîrsta de 2—3 luni ; de obicei pentru reproducţie se lasă într-o cuşcă, 4—5 zile, un mascul cu 5—6 femele, evitîndu-se de a se introduce, în aceeaşi cuşcă, doi masculi, deoarece aceştia se bat, se muşcă, pînă se omoară.

Durata perioadei de gestaţie este, în genere, de 65—67 de zile ; femela poate duce 4—5 gestaţii pe an ; după prima gestaţie dă naştere la 2—3 pui ; ulterior, numărul de pui creşte la 4—5 şi, în mod excepţional, la 7—8. După 2 ani, gestaţiile diminuează şi apoi cobaiul devine inapt pentru reproducere.

Cobaiul, de la naştere, are corpul acoperit cu păr, are dinţi, vede bine şi se poate alimenta, cu uşurinţă, din hrana mamei. Mama îşi alăptează puii 15—20 de zile, însă aceştia trebuie să primească, concomitent, şi hrană obişnuită ; puii hrăniţi exclusiv cu lapte de mamă mor foarte repede.

În genere, este mai greu de apreciat vîrsta unui cobai în funcţie de greutatea sa. Cobaiul ajunge la dezvoltarea completă, la vîrsta de 6 luni.

Greutatea medie a cobaiului după vîrstă

1 lună	60—70 g
2 luni	240—250 g
3 luni	350—400 g
4 luni	550—600 g
6 luni	650—700 g

Durata vieţii unui cobai este de aproximativ 3—5 ani.

Şoarecele

(Mus musculus)

Şoarecele, rozător din familia murideelor, fiind un animal de talie mică, uşor de îngrijit şi cu o capacitate mare de reproducţie, se foloseşte, în special, în experimentările biologice care necesită un număr mare de animale sau succesiunea mai multor generaţii.

Rasele de şoareci se deosebesc între ele prin culoarea părului : şoareci albi, cafenii, cenuşii sau roşcaţi, şoareci negri cu pete albe etc.

În genere, şoarecele alb (*Mus musculus*, varietatea *albinus*) este folosit ca animal de experienţă. Maturitatea sexuală a şoarecelui începe la vîrsta de 3—4 luni ; de obicei se utilizează un mascul la 5—6 femele.

Perioada de gestaţie durează 19—20 de zile ; o femelă poate duce 4—5 gestaţii anual, după 7—8 gestaţii devenind inaptă pentru reproducere.

Şoricioaicele gestante, în perioada terminală a gestaţiei, vor fi ţinute în borcane sau în cuşti, cu vată sau celuloză, pentru aranjarea culcuşului, şi vor primi hrană umedă sau apă, pentru a preveni deshidratarea din timpul nașterii, dezhidratare care face ca șoricioaica să-și mănînce puii.

Femela dă naștere de fiecare dată la 6—7 pui, lipsiți de păr și cu ochii închiși.

Puii nou-născuți nu vor fi atinși cu mîna, atît timp cît sînt lăsați lîngă mamă, deoarece aceasta, simțind miros străin, își va mînca puii.

Șoarecii încep să vadă la 11—13 zile după naștere, iar la 3 săptămîni mănîncă din hrana mamei, încît pot fi separați de aceasta.

Greutatea șoarecelui la diverse vîrste

La naștere	1 g
15 zile	3 g
1 lună	6 g
3 luni	14 g
4 luni	18 g
6 luni	20—25 g

Durata vieții unui șoarece alb este de 3—4 ani.

Șobolanul

(*Rattus norvegicus*)

Șobolanul face parte, ca și șoarecele, din familia murideelor; în experimentările biologice se utilizează șobolanul alb (varietatea *albinus*), care se aseamănă cu șoarecele, deosebindu-se de acesta numai prin mărimea taliei.

— Rasele de șobolani sălbateci: șobolanul surmulot (cel mai răspîndit în Europa), șobolanul negru, șobolanul de Alexandria sînt extrem de rar folosiți ca animale de laborator.

— Șobolanul alb este apt pentru fecundare și reproducere de la vîrsta de 4 luni.

Perioada de gestație durează 25—30 de zile, femela dă naștere, de fiecare dată, la 4—5 pui, fără păr, cu ochii închiși, pe care îi alăptează 15 zile; după 3 săptămîni, puii se alimentează normal.

Greutatea șobolanului după vîrstă

La naștere	7 g
15 zile	20 g
1 lună	40—45 g
2 luni	75—80 g
3 luni	90—110 g
1 an	120—130 g

Cazarea animalelor de laborator

Crescătoriile de animale de laborator se vor instala în clădiri special construite, la o oarecare depărtare de pavilionul animalelor de experiență; orientate spre răsărit, pentru a fi expuse acțiunii razelor solare și la adăpost de curenții de aer rece. În clădirile crescătoriilor de animale trebuie să se asigure o bună ventilație, o temperatură constantă în timpul iernii, precum și posibilitatea de a efectua curățenia cu ușurință.

Ventilația camerelor de animale cu sistemul obișnuit de ventilație, instalat în partea de sus a pereților este insuficientă ; se recomandă să se asigure aer condiționat.

Temperatura constantă, în timpul iernii, se realizează prin încălzire centrală cu apă caldă sau cu aburi. În timpul iernii, în crescătoriile de șoareci, temperatura trebuie să fie cuprinsă între 20 și 22°, în crescătoriile de cobai de 18°, iar în cele de iepuri de 14—16°.

Fluctuațiile de temperatură sînt dăunătoare sănătății animalelor, favorizînd infecțiile pulmonare.

Curățenia camerelor de animale trebuie să constituie una din principalele preocupări ale celor care folosesc animalele de experiență.

Camerele de animale vor avea apă curentă, precum și cîte un bac pentru spălarea și dezinfectarea cuștilor. Pardoseala se va face din ciment sau gresie, pe un plan înclinat către un sifon, pentru scurgerea apelor de spălare.

Carantina animalelor nou recepționate se face într-o clădire mai mică situată la aproximativ 50 m depărtare de clădirea crescătoriei.

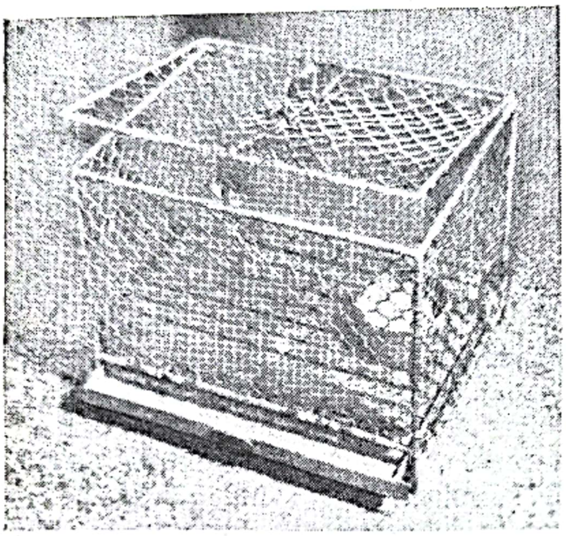


Fig. 59. — Cușcă de metal pentru iepuri.

Izolarea animalelor bolnave se face, de asemenea, într-o altă clădire, situată la aproximativ 100 m de clădirea principală a crescătoriei.

Cuștile de animale. Animalele de experiență se țin în cuști speciale.

Cuștile pentru iepuri și cobai se fac din lemn, din ciment și din metal.

Cuștile din lemn se folosesc, în genere, pentru întreținerea iepurilor în aer liber și prezintă o serie de dezavantaje : sînt greu de spălat și dezinfectat, iar pereții lor sînt distruși de rozătoare, atît de cele de experiență, cît și de altele dinafară (șobolani, dihori).

Cuștile din ciment sînt boxe betonate, fixate pe pereții încăperilor : curățirea și spălarea acestor boxe se face destul de ușor, însă în timpul verii, cimentul îmbibat cu urină emite un puternic miros de amoniac, datorită cantității mai mari de urină pe care o elimină animalele, hrănite cu furaje verzi ; în timpul iernii, fiind reci, favorizează apariția infecțiilor pulmonare.

Cuștile din metal se confecționează, fie dintr-o rețea de metal sau de sîrmă, care se fixează pe un schelet de fier, fie din tablă galvanizată, cu un perete care constituie o portiță, din rețea de sîrmă.

Unele modele sînt prevăzute, la partea inferioară, cu o tavă din tablă galvanizată, în care se adună excrementele animalului și resturile alimentare ; tava se poate scoate și curăța cu ușurință.

Se preferă folosirea cuștilor din metal, deoarece sînt ușor de spălat și dezinfectat, ușor de transportat și nu pot fi roase de animale.

Cuştile din metal se ţin în crescătoriile de animale pe suporturi de metal sau de beton, special construite. Dimensiunile cuştilor pentru iepuri sînt cuprinse între 0,45 m şi 0,50 m, iar înălţimea, de 0,40 m; în genere nu se ţin mai mult de 2 iepuri într-o cuşcă.

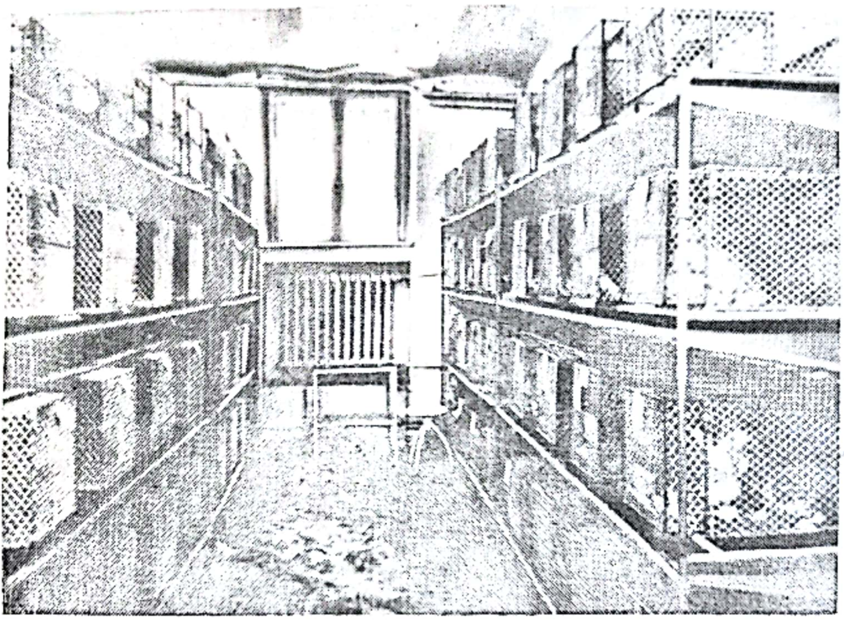


Fig. 60. — Cameră de animale.

Cuştile pentru cobai pot fi de dimensiuni mai mici; în mod obişnuit se ţin cam 10—12 cobai într-o cuşcă. În genere, nu se recomandă să se ţină mai multe animale, laolaltă, chiar dacă este o cuşcă încăpătoare, deoarece animalele se îngrămădesc şi se sufocă.

Iepurii şi cobaii stau în cuşti, pe un grătar din lemn, pe care se pune un strat de fîn.

Cuştile pentru şoareci şi şobolani se fac din lemn şi din metal.

Cuştile din lemn, mai rar folosite, sînt confecţionate dintr-o plasă de sîrmă, fixată pe un cadru de lemn.

Cuştile din metal sînt asemănătoare celor pentru iepuri şi cobai, cu singura deosebire că sînt de dimensiuni mai mici.

În majoritatea laboratoarelor, şoarecii şi şobolanii se ţin în borcane de sticlă, cu gură largă, acoperite cu un capac din plasă de sîrmă, pentru a permite pătrunderea aerului în interiorul borcanului. Pe fundul borcanelor se pune un strat de boabe de ovăz sau de răzătură de lemn, pentru ca animalele să nu stea direct pe sticlă.

În genere, se recomandă pentru instalarea şoarecilor şi a şobolanilor cuştile din metal, deoarece borcanele de sticlă sînt fragile şi prezintă o suprafaţă redusă pentru mişcările animalelor, cu toate că urmărirea, în cursul experienţelor, se face mai uşor în borcanele de sticlă.

S-au confecţionat cuşti din material plastic dar acestea prezintă dezavantajul că nu pot fi sterilizate.

Spălarea şi dezinfecţia cuştilor. Menţinerea curăţeniei cuştilor sau a borcanelor, în care se ţin animalele de laborator, este o condiţie esenţială pentru a obţine rezultate exacte în experimentările biologice.

Cuştile de animale trebuie spălate de 3 ori pe săptămînă, cu un jet de apă şi cu peria, pentru a îndepărta toate materiile aderente de pereţii cuştilor. Dezinfecţia cuştilor în care se ţin animalele inoculate ar trebui făcută la 10 zile; în practică nu se face decît după terminarea perioadei de urmărire a experienţei.

Dezinfecţia cuştilor din ciment se face prin spălare cu o soluţie puternic antiseptică sau, de preferat, prin arderea pereţilor cuştii cu o lampă de sudură. Dezinfecţia cuştilor din metal se face prin menţinerea, cîteva ore, într-un lac sau bazin, cu o soluţie antiseptică sau prin sterilizare în etuve mari.

Borcanele de sticlă trebuie spălate şi dezinfectate, de două ori pe săptămînă; dezinfectarea borcanelor de sticlă se face la fel ca a cuştilor de metal.

Antisepticele care se folosesc, în mod obişnuit, pentru dezinfecţia cuştilor şi borcanelor sînt: cloramina 2—5%, fenolul 3—5%, creolina 5%, lizolul 3—5$^0/_0$, formolul 1—5$^0/_0$ etc. Laptele de var şi clorura de var se folosesc pentru dezinfecţia pereţilor, podelelor şi a solului.

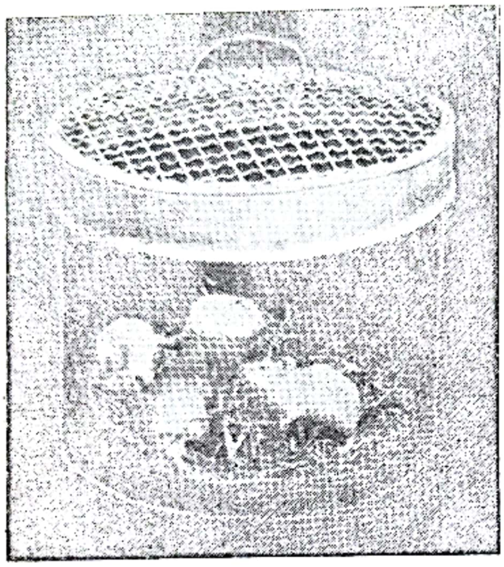


Fig. 61. — Borcan pentru şoareci.

Aşternutul animalelor din cuşti sau borcane (fîn, ovăz, rădătură de lemn) se schimbă o dată cu spălarea cuştilor şi borcanelor, pentru a evita mirosul puternic pe care-l emite urina fermentată.

Hrana animalelor

Hrana animalelor de laborator trebuie să conţină aceleaşi principii alimentare ca şi a animalelor domestice: proteine, glucide, lipide, săruri minerale, factori de creştere şi vitamine.

Alimentele care se administrează animalelor sînt de mai multe categorii:

1. Nutreţuri concentrate: grăunţe de ovăz, mei, mazăre, porumb, grîu, seminţe de floarea soarelui etc.;
2. nutreţuri suculente: plante tuberoase şi rădăcinoase: morcov, sfeclă, gulie, dovleac, cartof;
3. nutreţuri verzi: iarbă proaspătă, frunze de legume, trifoi, lucernă, salată, spanac, păpădie etc., iar în timpul iernii, vîrfuri verzi de ovăz încolţit;
4. nutreţuri brute: fînul, paiele de orz, ovăz, grîu etc.;
5. produsele şi reziduurile industriei alimentare: tărîţe de grîu, turte de floarea soarelui, de in şi de cînepă, pîine, pesmeţi;
6. hrană de origine animală: lapte;
7. substanţe minerale: pudră de oase, cretă, clorură de sodiu;
8. vitamine: untură de peşte, riboflavină sintetică.

Rația alimentară zilnică se va adapta după anotimp și posibilitățile locale de aprovizionare, avînd grijă să cuprindă toate principiile alimentare, îndeosebi cantitatea necesară de vitamine; lipsa acestora duce la hipovitaminoză sau avitaminoză, care scad rezistența animalelor în experiență, falsificînd rezultatele probelor biologice.

Rația alimentară a reproducătorilor masculi și femele, precum și a femelelor gestante, va fi mai complexă decît a celorlalte animale.

Hrana animalelor se poate da sub forma unei paste umede, a unei pudre uscate, sub formă de biscuiți sau neprelucrată. Hrana nu se va depune pe așternutul din cușcă, mai ales cînd este sub formă de pastă umedă, deoarece se amestecă cu excrementele și fermentează.

Hrana se va depune în obiecte speciale care să nu permită animalului să murdărească sau să împrăștie hrana.

Rația alimentară, zilnică, a animalelor în experiență, în Institutul Dr. I. Cantacuzino

	Lapte	Pîine	Ovăz	Morcov Sfeclă Verdeață	Fîn
Iepuri	—	—	60	300	150
Cobai	—	—	40	100	50
Şoareci	4	4	4	—	—
Şobolani	15	15	15	—	—

(Cantitățile sînt exprimate în grame)

Se va avea grijă ca alimentele să se distribuie cît mai proaspete, mai ales în timpul verii, cînd furajele fermentate produc la iepuri tulburări intestinale grave.

Kennaway (1943) a arătat că animalele de laborator au nevoie de o cantitate de apă, în plus, față de cea furnizată de alimentele verzi.

Apa se pune la dispoziția animalelor, de obicei într-un balon de sticlă, cu o capacitate de aproximativ 200 ml, care se fixează, răsturnat și ușor înclinat, de pereții cuștii. Apa se scurge printr-un tub de metal sau de sticlă care se adaptează la balon prin intermediul unui dop de cauciuc, animalul își ia apa necesară sugînd din tub.

Bolile animalelor de laborator

Bolile animalelor de laborator, în special bolile infectocontagioase, trebuie binecunoscute de experimentatori, atît pentru a îndepărta primele cazuri de îmbolnăvire și a lua măsurile profilactice necesare în vederea limitării epidemiei, cît și pentru a diferenția, în cazul animalelor inoculate experimental, leziunile provocate de inocularea experimentală, de cele provocate de o infecție acută, datorită exacerbării virulenței unor germeni saprofiți.

Epidemiile se propagă în crescătoriile de animale prin:

a) contagiune directă: animalele sănătoase se contaminează de la cele bolnave prin secreția nazală sau faringiană, urină, praful din aer etc.;

b) contagiune indirectă: îngrijitorii de animale, nerespectînd regulile de profilaxie, transmit infecția de la animalele bolnave celor sănătoase, în momentul distribuirii hranei sau al curățirii cuștilor.

Extinderea epidemiilor depinde, pe de o parte, de virulenţa germenilor, iar pe de altă parte, de receptivitatea individuală, care creşte în urma scăderii rezistenţei animalelor sub influenţa unor factori, ca : frigul, umiditatea, variaţiile de temperatură, aeraţia insuficientă, regimul alimentar neechilibrat, instalarea cuştilor în condiţii necorespunzătoare etc.

Prin analogie cu cele constatate în epidemiologia umană, s-a emis ipoteza purtătorilor de germeni care ar fi cauza izbucnirii epidemiilor. S-a constatat că, uneori, iepurii, cobaii sau şoarecii vindecaţi de pasteureloză sau salmoneloze rămîn purtători de germeni, prezentînd posibilitatea de a contamina animalele din jurul lor.

Pentru a preîntîmpina izbucnirea epidemiilor în crescătoriile de animale, se impune carantinarea tuturor animalelor care vin din afară.

Bolile iepurelui

Boli de nutriţie

— Distrofia musculară de nutriţie, datorită avitaminozei E, se manifestă prin emacierea musculaturii dorsale şi a trenului posterior.

— Enterita mucoidă evoluează lent, fără febră, singurul simptom fiind diareea, animalul se caşectizează şi moare. Boala cuprinde iepurii, indiferent de vîrstă, însă procentul de mortalitate este mai mare la cei tineri. Cauza acestei afecţiuni este atribuită unor factori de nutriţie, necunoscuţi încă sau unor factori ereditari.

Boli provocate de bacterii

Pasteureloza este o boală foarte contagioasă, comună iepurilor şi cobailor, provocată de germeni din genul *Pasteurella.*

Forma acută de boală reprezintă forma clinică cea mai frecventă ; începe cu o coriză sero-purulentă sau purulentă.

Secreţia nazală umezeşte perii din jurul nasului şi perii labelor anterioare : marginile narinelor se ulcerează superficial şi se acoperă de cruste.

Propagarea infecţiei la mucoasa sinusurilor se manifestă prin edemul feţei. Instalarea dispneei indică apariţia complicaţiilor pulmonare; animalul strănută, pentru a înlătura mucozităţile care obturează căile respiratorii; deseori apar tulburări intestinale foarte accentuate.

În genere, animalul moare în 5—8 zile.

Pasteureloza evoluează uneori sub o *formă supraacută* cu debut brusc, temperatură ridicată ; animalul rămîne imobilizat într-un colţ; moartea survine în 24—48 de ore.

Spre sfîrşitul epidemiilor boala are o *evoluţie subacută* : la început singura manifestare este scăderea în greutate a animalelor, apoi se instalează fenomenele caracteristice formei acute.

Forma cronică se caracterizează prin apariţia de abcese, închistate în ţesutul celular subcutanat al regiunii cervicale posterioare, lombare sau dorsolombare; prin puncţie se scoate un puroi albicios, cremos. Abcesele au în genere o evoluţie lentă : uneori, după fistulizare, se vindecă, alteori survin complicaţii pulmonare, grave, care provoacă moartea animalelor.

Diagnosticul bolii se face prin izolarea germenilor din genul *Pasteurella*, în urma însămînțărilor efectuate din: sînge, măduva oaselor, diverse organe (splină, ficat, rinichi) și puroi.

Epidemiile de pasteureloze sînt mai frecvente și mai grave la iepuri decît la cobai; incidența lor este crescută primăvara și toamna.

Morbiditatea este de 50—60%, iar mortalitatea de 40—50%.

În crescătorii, proporția iepurilor sănătoși, purtători de pasteurele variază, cu anotimpul, între 5 și 15%.

În afară de pasteurele, *B. bronhiseptica* determină, la iepure, fenomene de rinită acută, cu jetaj seros sau purulent care se poate complica cu fenomene pulmonare.

Pseudotuberculoza, boală provocată de *Pasteurella pseudotuberculosis*, este comună aproape tuturor rozătoarelor; Malassez și Vignal au descris, în 1883, simptomele acestei boli.

Pseudotuberculoza evoluează la iepuri în mod frecvent sub o formă subacută: la început animalul scade în greutate, devine somnolent, apoi prezintă tulburări intestinale, temperatură ridicată și, în cele din urmă, devine dispneic. Clinic, nu se constată hipertrofie ganglionară. Iepurele moare prin cașexie. La autopsie se constată leziuni caracteristice:

a) hipertrofia ganglionilor mezenterici, care sînt în mare parte cazeificați;

b) tuberculi hepatici, splenici și epiploonici, de asemenea cazeificați.

Epidemiile grave de pseudotuberculoză distrug 50—60% din efectivul de animale, avînd o incidență mai crescută în timpul iernii.

Depistarea animalelor infectate se poate face cu ajutorul intradermoreacției Saenz și Costil: se inoculează intradermic 0,1 ml suspensie de *P. pseudotuberculosis*, omorîtă cu formol, conținînd 0,01 g/ml; animalul infectat prezintă la locul inoculării, după 24 de ore, un eritem violaceu, cu centrul necrotic.

Tuberculoza apare la iepurii care au avut contact cu animalele tuberculoase. Diagnosticul se face prin examenul anatomopatologic și bacteriologic.

Listerioza, boală provocată de *Listeria monocytogenes*, determină moartea animalelor prin cașexie, la autopsie se constată focare necrotice în viscere, în special în ficat și leziuni inflamatoare la nivelul peritoneului; la femelele gravide, fătul este emaciat.

Boli provocate de spirochete

Spirochetoza, relativ frecventă la iepurii domestici, se manifestă prin apariția de papule pe pielea organelor genitale externe; papulele se transformă în vezicule care se ulcerează, apoi se acoperă de cruste.

Generalizarea leziunilor provoacă moartea animalelor.

Agentul cauzal: *Treponema cuniculi* se pune în evidență, în serozitatea pustulelor, prin examen ultramicroscopic.

Boli provocate de virusuri

Variola, la iepure, apare numai în crescătoriile unde au fost animalele infectate.

Boala se manifestă prin apariţia de:

a) simptome oculare: blefarită, conjunctivită, keratită, ulcere corneene etc.;

b) simptome cutanate: apariţia pe piele, de papule care nu se transformă în pustule, însă lasă cicatrice după vindecare;

c) simptome genitale: apariţia unui edem scrotal sau vulvar.

Mortalitatea este de 70% la animalele tinere şi de 15% la cele adulte.

Mixomatoza. Agentul cauzal, un virus, se transmite prin contact direct sau prin intermediul unei insecte vectoare.

Boala începe cu o bleforoconjunctivită severă, urmată de îngroşarea mucoasei palpebrale, nazale, genitale şi anale şi de apariţia de tumori cutanate pe tot corpul.

Mixomatoza se răspîndeşte rapid şi dă un mare procent de mortalitate.

Papilomatoza se manifestă prin apariţia pe suprafaţa tegumentelor şi a mucoaselor, a unor tumorete sesile sau pediculate.

Boli provocate de protozoare

Coccidioza, cea mai frecventă dintre bolile provocate de protozoare, este cauzată de următoarele specii de coccidii: *Eimeria perforans* şi *Eimeria perforans*, var. *magna*, care se localizează pe mucoasa intestinului subţire şi *Eimeria stiedae*, care se localizează pe epiteliul caniculelor biliare.

În funcţie de localizarea agentului cauzal se deosebesc 2 forme clinice:

— coccidioza intestinală; se manifestă prin tulburări intestinale: scaune frecvente, meteorism abdominal etc. Boala are o evoluţie acută la animalul tînăr şi evoluţie cronică la animalul mai mare de 4 luni;

— coccidioza hepatică: pe lîngă manifestările formei intestinale prezintă şi hipertrofia ficatului.

Boli provocate de helminţi

Cisticercoza hepatică şi peritoneală. Iepurele este gazda intermediară a parazitului *Taenia pisiformis*, a cărui gazdă definitivă este cîinele.

Iepurii, aparent sănătoşi, prezintă la autopsie numeroase vezicule pe micul epiploon, la nivelul inserţiei sale gastrice; veziculele conţin un lichid citrin, în care se găsesc cisticerci de *Taenia pisiformis*.

Distomatoza este cauzată de *Fasciola hepatica* şi *Dicrocoelium lanceolatum*, care provoacă formarea de chisturi musculare şi hepatice.

Alte boli

Rîia, afecţiune frecventă la iepuri şi mai rară la cobai, este provocată de 3 specii de acarieni: *Sarcoptes scabiei*, *Notoedres cati* şi *Psoroptes cuniculi*.

Boala începe cu apariţia de cruste pe nas, pe buze, în pavilionul urechii şi se generalizează apoi pe tot corpul, provocînd mîncărimi.

Psoroptes cuniculi se localizează de la început în pavilionul urechii, determinînd mîncărime, cruste şi apoi o secreţie gălbuie, fetidă.

Diagnosticul clinic se face cu uşurinţă, după aspectul şi localizarea leziunilor: acarienii se pot pune în evidenţă în crustele recoltate de pe piele, identificîndu-se după aspectul lor morfologic.

Tumori benigne şi maligne se pot dezvolta pe diverse ţesuturi şi organe.

Frecvenţa tumorilor este mai mare la iepure decît la cobai.

Bolile cobaiului

Boli de nutriţie

Scorbutul, datorit unei avitaminoze C, determină moartea animalelor prin caşexie; la autopsie se constată o lărgire a joncţiunilor costo-condrale şi peteşii hemoragice la nivelul seroaselor.

Calcifierea ţesuturilor moi se caracterizează prin formarea de depozite de calciu în miocard, în peretele stomacului, în rinichi şi la nivelul colonului, provocînd ocluzii intestinale. Leziunile fiind asemănătoare celor din hipervitaminoza D, se consideră că boala ar fi datorită unor factori nutritivi.

Boli provocate de bacterii

Salmoneloza evoluează ca o infecţie acută sau cronică, însoţită totdeauna, de tulburări gastrointestinale. Infecţia este cauzată de *S. typhimurium*, *S. enteritidis gärtner* şi *S. reading*; aceşti germeni se izolează în cursul bolii, din sînge şi viscere. La autopsie se constată splenomegalie, hepatomegalie, noduli necrotici în viscere şi congestie intestinală.

Pasteureloza cobailor este asemănătoare pasteurelozei iepurilor ca simptomatologie şi etiologie. Receptivitatea la boală este mai mare la cobaii tineri şi la femelele pline.

Epidemiile de pasteureloză sînt mai puţin frecvente la cobai decît la iepuri.

Pseudotuberculoza provocată de *Pasteurella pseudotuberculosis* evoluează la cobai sub formă acută sau sub o formă subacută.

Forma acută debutează brusc, cu dispnee accentuată, agitaţie, secuse musculare; animalul moare în 24-48 de ore; diagnosticul se pune numai la necropsie. Leziunile anatomopatologice sînt identice cu cele de la iepure.

Forma subacută, mai frecventă decît cea acută, începe insidios, cu slăbirea animalului care în cele din urmă, se caşectizează. La examenul obiectiv se constată, în regiunea subombilicală, o masă profundă, neregulată aderentă de cec; acest simptom, constant la cobai cu pseudotuberculoză, este datorit hipertrofiei ganglionilor mezenterici.

Cobaii mor după 20-25 de zile de boală.

Pasteurella pseudotuberculosis este foarte răspîndită în natură; cobaii se infectează cu uşurinţă, prin ingerarea furajelor contaminate.

Epidemiile grave de pseudotuberculoză la cobai distrug pînă la 75% din efectivul de animale.

Septicemii. O serie de specii microbiene: pneumococul, streptococul, klebsielele şi salmonelele determină, la cobai, infecţii septicemice.

Infecţiile pulmonare: pneumonia, bronhopneumonia sînt determinate de diverse specii bacteriene: *D. pneumoniae, Klebsiella B. bronchiseptica, Pasteurella*, streptococi grup C Lancefield etc.

Infecţiile pulmonare debutează brusc, cu temperatură ridicată şi simptome pulmonare: respiraţie superficială, zgomotoasă, dispnee, cianoză; după 5-6 zile cobaii mor.

Adenita supurată a cobaiului poate fi provocată de mai mulţi germeni: *Streptobacillus moniliformis*, streptococi grup C Lancefield sau de un anaerob: *Spherophorus caviae.*

Boala începe cu hipertrofia unui ganglion cervical sau submaxilar: ganglionul se fistulează; după evacuare, se vindecă.

Cazurile mortale sînt rare şi apar în urma complicaţiilor pulmonare.

Adenita supurată a fost mult timp confundată cu pseudotuberculoza.

Boli provocate de protozoare

Toxoplasmoza cobaiului nu are o simptomatologie caracteristică. Diagnosticul se face prin punerea în evidenţă a agentului cauzal, *Toxoplasma caviae*, pe frotiurile din splină şi ficat: paraziţii coloraţi prin metoda Romanowscki apar ca elemente mari, ovalare, cu un nucleu central.

Coccidioza cobaiului este cauzată de *Eimeria caviae*, care se dezvoltă pe mucoasa intestinului subţire; animalul prezintă tulburări intestinale. Diagnosticul se face prin punerea în evidenţă a oociştilor în scaunele diareice ale cobailor.

Diareea cu trichomonas este cauzată de protozoarul *Trichomonas caviae*, care se găseşte în scaunele diareice ale animalelor bolnave; uneori se izolează şi de la animalele sănătoase.

Boli provocate de helminţi

Distomatoza cobaiului este provocată de *Fasciola hepatica L* sau *Distomum caviae*; se caracterizează prin hepatomegalie şi formarea de chisturi musculare şi hepatice, prin puncţionarea cărora se obţine un lichid roşiatic.

Diagnosticul se face prin punerea în evidenţă a fasciolei hepatice în lichidul chisturilor sau în canaliculele biliare.

Boli provocate de ciuperci

Tricofiţia cobaiului este destul de frecventă la animalele tinere: se manifestă prin apariţia unor papule, acoperite de cruste pe piele; perii din jurul leziunilor sînt casanţi la început apoi se desprind.

Agentul cauzal al afecţiunii: *Trichophyton gypseum asteroides* se poate pune în evidenţă prin însămînţări pe mediul Sabouraud sau direct, prin examinarea firului de păr într-o picătură de soluţie de hidrat de potasiu 10%; firul de păr apare înconjurat de o teacă în care se găsesc sporii tricofitonului, dispuşi în lanţuri.

Alte boli

Tumori. Cobaiul este animalul de laborator care are cea mai mică tendinţă de dezvoltare a tumorilor.

Bolile şoarecelui

Manifestările morbide ale şoarecelui sînt asemănătoare cu ale iepurelui sau cobaiului, însă cu o simptomatologie mai ştearsă decît la iepuri sau cobai.

Cea mai mare parte din bolile şoarecelui evoluează fără simptome; deseori dimineaţa animalul este vioi pentru ca, în cursul după amiezii, să moară în cîteva minute.

Bolile animalelor de talie mică prezintă, în genere, o simptomatologie imprecisă.

Boli provocate de bacterii

Pasteureloza evoluează la şoarece sub o *formă supraacută*, care omoară animalele în cîteva ore, sau sub o *formă acută*, care începe cu conjunctivită, rinită şi diaree; animalele mor în 2-3 zile. Diagnosticul se face prin izolarea din sîngele, splina sau ficatul şoarecelui mort, a unor germeni din genul Pasteurella (P. *muriseptica*, *P. muricida*).

Boala evoluează, uneori, sub o formă cronică.

Salmoneloza este considerată, de unii cercetători, cea mai frecventă boală infecţioasă a şoarecelui. Incubaţia, în condiţii naturale, este de 3-6 zile. Infecţiile cu germeni din genul *Salmonella* evoluează uneori, supraacut; animalul moare în cîteva ore sau, alteori, boala are o evoluţie mai lungă: 10-15 zile. Simptomele importante sînt: diareea şi scăderea în greutate.

La autopsie se constată leziuni importante la nivelul intestinului: hipertrofia sau chiar ulcerarea plăcilor Peyer, hipertrofia ganglionilor mezenterici, splenomegalie şi hepatomegalie.

Diagnosticul se face numai prin izolarea salmonelelor din sînge, ficat sau splină; se izolează frecvent de la şoarece: *S. typhimurium* şi *S. enteritidis*. Şoarecele prezintă o deosebită sensibilitate la infecţiile cu germeni din genul *Salmonella* încît acestea sînt, în genere, mortale pentru şoarece.

Infecţiile pulmonare. Pneumonia, bronhopneumonia sînt provocate în genere de *D. pneumoniae* şi mai rar de *B. bronchiseptica* sau de *Pasteurella*.

Şoarecele este animalul cel mai sensibil la *D. pneumoniae*; moare în cîteva ore, cu dispnee; germenele se izolează din sînge, splină şi ficat.

Reumatismul infecţios al şoarecelui alb este provocat de *Streptobacillus moniliformis*.

Boala are uneori o evoluţie lentă, manifestîndu-se prin mărirea volumului articulaţiei şi prin infiltraţia ţesutului articular subiacent; aceste simptome apar mai întîi, la articulaţiile tarsiene, apoi se extind şi la alte articulaţii; alteori, evoluţia este atît de rapidă, încît animalul moare înainte de apariţia fenomenelor articulare.

Boli provocate de virusuri

Boala Tyzzer, provocată de un germene sporulat: *Bacilus piliformis*, evoluează sub formă acută, cu diaree severă; animalul moare în 24-48 de ore.

La necropsie, mucoasa intestinală apare intens congestionată, iar ficatul prezintă mici focare necrotice, din care se poate izola agentul cauzal.

Ectromelia este o infecţie virotică care evoluează cu leziuni patognomonice: formarea de vezicule, pline cu un lichid seros, la nivelul membrelor; veziculele se acoperă apoi cu o crustă gălbuie, iar în unele cazuri se complică cu leziuni de necroză care interesează întreg fragmentul osteo-muscular, producînd amputaţii ale membrelor.

Coriomeningita limfocitară. Şoarecele sălbatec sau de crescătorie este rezervorul de virus al coriomeningitei limfocitare; mortalitatea şoarecilor este destul de scăzută în urma acestei infecţii virotice.

Boli provocate de ciuperci

Favusul se manifestă prin apariţia, pe pielea capului, a unor cruste care se extind apoi pe întreg corpul. Crustele prezintă, în centru, o depresiune caracteristică: godeul favic.

Boala este determinată de o varietate de *Achorion*: *Sabourautides quinckeanus.*

Tricofiţia şoarecelui are acelaşi aspect ca la cobai.

Boli provocate de protozoare

Coccidioza şoarecelui este provocată de coccidia *Eimeria falciformis*. Boala evoluează cu diaree, avînd un caracter mai acut la animalele tinere.

Kloselioza. Agentul cauzal al afecţiunii este: *Coccidium klosellia muris*, care pătrunde în organism pe cale digestivă: animalele infectate pot supravieţui 2 ani; moartea survine în urma complicaţiilor pulmonare.

Sarcosperidioza. Sarcocystis muris se dezvoltă în muşchii animalului infectat; se pune în evidenţă pe frotiurile din muşchi colorate prin metoda Romanovski.

Boli provocate de helminţi

Cisticercoza hepatică se constată numai la autopsii, prin descoperirea pe suprafaţa ficatului a unor chisturi mici albicioase, în interiorul cărora se găsesc cisticercii de *Taenia taeniaeformis.*

Distensia veziculei biliare şi hipertrofia ficatului se constată, de asemenea, la autopsie; pe suprafaţa ficatului se văd o serie de puncte albicioase care indică locul de pătrundere în ficat al cestodului *Hymenolepis nana.*

Alte boli

Tumorile. Majoritatea tumorilor benigne şi maligne, cunoscute, se pot dezvolta în ţesuturile şoarecelui; frecvenţa lor este destul de crescută la aceste animale.

Bolile şobolanului

Bolile şobolanului, provocate de diverse bacterii, virusuri, ciuperci, protozoare, helminţi, sînt în genere asemănătoare celor descrise la şoarece. Se desprind ca entităţi morbide specifice şobolanului următoarele afecţiuni :

Infecţia cronică respiratorie, afecţiune frecventă a şobolanilor, se observă mai des la şobolanii tineri, dar evoluează mai grav la cei vîrstnici.

Boala se manifestă cu fenomene de rinită cronică, otită medie, labirintită etc. Aceste leziuni inflamatoare determină bronşiectazii sau abcese pulmonare, cu evoluţie lentă. S-au incriminat, ca agenţi etiologici ai acestei afecţiuni : *Streptobacillus moniliformis* sau germeni din grupul pleuropneumoniei.

Pesta. Şobolanii sînt animalele cele mai receptive infecţiei cu *Pasteurella pestis* ; de la aceştia boala se transmite la om, prin intermediul insectelor hematofage. Pesta şobolanului are de cele mai multe ori o evoluţie cronică, la început se constată hipertrofia unui ganglion, din regiunea gîtului ; ulterior ganglionul se fistulează, iar animalul se caşectizează şi moare. Diagnosticul se face prin izolarea germenului şi reproducerea bolii la animale sensibile : cobai şi şoareci.

Spiriloza şobolanului sălbatic. Agentul patogen al acestei afecţiuni : *Spirillum morsus muris* determină la şobolan o infecţie asemănătoare sifilisului la om.

Spirilul se pune în evidenţă prin examen ultramicroscopic, în sînge şi în diverse exsudate.

Şobolanul infectat transmite la om, prin muşcătură, boala denumită : Sodoku.

Boli inaparente. Şobolanii sălbatici sînt deseori purtătorii unor specii microbiene patogene pentru om, care se transmit fie direct de la şobolan, fie prin intermediul unor insecte hematofage.

— *Leptospira icterohaemorrhagiae, L. autumnalis, L.hebdomadis* etc. se transmit la om prin intermediul alimentelor sau obiectelor contaminate de urina animalelor purtătoare de leptospire.

— *Borrelia hispanica,* agentul patogen al febrei recurente hispano-africane, se transmite de la şobolan la om prin intermediul unei insecte hematofage : *Ornitodorus moubata.*

— *Rickettsia mooseri* agentul patogen al tifosului murin, se transmite la om prin intermediul purecelui, păduchelui şi al căpuşelui.

Contenţia animalelor

Cunoaşterea modului de manipulare a animalelor de laborator constituie o obligaţie a oricărui cercetător în domeniul biologiei. Contenţia sau imobilizarea animalelor în vederea inoculărilor se face manual sau cu ajutorul aparatelor.

Contenția manuală

Evitarea mușcăturilor sau a zgîrieturilor, precum și rapiditatea manoperelor se realizează prin respectarea regulilor de prindere și imobilizare a animalelor de experiență. Acestea trebuie manipulate cu blîndețe, fără a fi lovite sau aruncate.

Iepurele se prinde de o ureche sau de pielea spatelui; imobilizarea sa, în vederea inoculării, se face fixîndu-l pe o masă, prin aplicarea mîinii stîngi pe trenul posterior. iar a mîinii drepte în jurul toracelui.

Imobilizarea iepurelui pentru inoculările în coapsă se mai poate face prin prinderea animalului cu mîna dreaptă de labele posterioare, proiectarea sa în axila stîngă și fixarea sa cu ajutorul brațului.

Cobaiul se prinde de spate, cuprinzînd toracele și membrele anterioare; examinarea feței ventrale se face prin sprijinirea spatelui animalului în palma dreaptă și fixarea membrelor posterioare cu mîna stîngă.

Șoarecele și *șobolanul* se prind de coadă și se așază pe o suprafață rugoasă; ținînd în continuare animalul de coadă, se prinde cu două degete de ceafă.

Contenția cu aparate

Contenția animalelor se face cu aparate speciale de contenție sau cu diverse dispozitive improvizate.

Contenția iepurilor și cobailor se face cu următoarele aparate: aparatul Malassez, aparatul Latapie, aparatul Benichon și aparatul Giroud; toate aceste aparate se bazează pe același principiu: imobilizarea animalelor pe o planșetă de lemn sau de metal, prevăzută cu un sistem de fixare a capului și a membrelor anterioare și posterioare. Dintre aceste aparate, aparatul sau masa Latapie este mai frecvent folosită în laboratoare.

Aparatul Latapie este alcătuit dintr-o planșetă de lemn sau o placă de metal, prevăzută, la cele două extremități, cu cîte un dispozitiv mobil, pentru fixarea capului și a membrelor anterioare și posterioare.

Imobilizarea animalului cu aparatul Latapie se face în felul următor: se așază animalul pe planșeta aparatului, apoi se fixează membrele posterioare la dispozitivul de fixare a membrelor posterioare cu ajutorul unor inele, care se prind în unghiul format de flexia gambei pe coapsă; se întinde apoi animalul pe masă și se fixează capul, potrivindu-se între cele două maxilare botnița dispozitivului de fixare a capului.

Labele anterioare, ca și cele posterioare, se imobilizează cu inele care se prind în unghiul articulației și apoi, cu ajutorul unor lanțuri, se fixează la marginile planșetei.

Marea mobilitate a dispozitivului de fixare a membrelor posterioare în plan orizontal și vertical permite fixarea animalului, atît pe fața dorsală, cît și pe cea ventrală.

Aparatul Latapie imobilizează complet animalul, încît un singur experimentator poate efectua, fără ajutor, diverse inoculări sau prelevări de sînge.

Contenția iepurilor se mai poate face cu ajutorul unui dispozitiv alcătuit dintr-o cutie de lemn (cu o lungime de 50 cm și lățime de 20 cm), acoperită cu un capac; marginea anterioară a capacului şi marginea superioară a feţei anterioare a cutiei sînt scobite, pentru a menţine în afară capul animalului fără să-i comprime gîtul. Imobilizarea iepurelui se face în felul următor: se introduce animalul în cutie, se închide capacul, lăsînd capul animalului în afară, astfel încît abordarea venei marginale a urechii se face cu uşurinţă.

Acest dispozitiv se poate improviza în orice laborator.

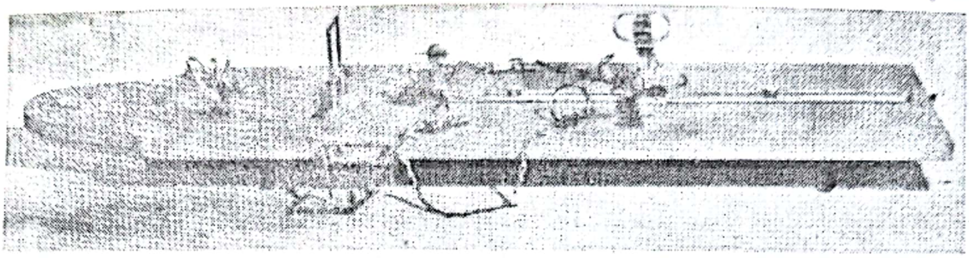


Fig. 62. — Masă de contenţie.

Contenţia şoarecilor şi şobolanilor se face, pentru inoculările intravenoase, cu ajutorul unui dispozitiv format dintr-un cilindru de metal perforat, acoperit la un capăt cu un dop de cauciuc sau de plută, iar la celălalt capăt prevăzut cu un mic orificiu, prin care se scoate în afară coada animalului.

Contenţia animalului se face în felul următor: se introduce animalul în dispozitiv, în aşa fel încît să i se scoată coada prin orificiul de la unul din capetele dispozitivului. Se prinde animalul de coadă şi se astupă celălalt capăt al dispozitivului cu dopul; animalul astfel imobilizat poate fi inoculat în venele caudale, fără ajutor.

Inoculările la animale

Inoculările la animale se fac pe diverse căi: cutanată, subcutanată, intramusculară, intravenoasă, intraperitoneală, intracerebrală, intratraheală sau digestivă etc.

1. Inocularea cutanată

Inocularea cutanată se face pe două căi: epidermică şi intradermică.

Inocularea epidermică se face prin depunerea produsului de inoculat pe stratul cornos al pielii intacte. Se practică, în prealabil, tunderea sau epilarea cu o grijă deosebită, pentru a evita producerea de excoriaţii ale pielii, care, acoperindu-se ulterior de cruste, ar îngreuna interpretarea rezultatelor.

Tunderea în bune condiţii se practică cu aparatul electric de tuns, care lasă pielea intactă, încît imediat se poate practica inocularea.

Epilarea se face cu ajutorul unei paste care se întinde pe suprafaţa pielii; după cîteva minute se spală cu apă, pentru a uşura căderea părului; dacă nu se desprind toţi perii, se repetă manopera. După epilare, deseori, pielea rămîne edemaţiată, încît se recomandă ca inocularea să se facă după 24 de ore.

Formula unui epilator pentru iepuri şi cobai

(După J. Dumas)

Monosulfură de Na	30 g
Apă	70 g

Această pastă se poate folosi 5—6 zile după preparare; ulterior se alterează.

Inocularea intradermică se face în două feluri:

— prin depunerea produsului de inoculat pe suprafaţa pielii al cărei epiderm a fost uşor lezat, prin smulgerea părului sau prin scarificarea superficială, evitînd de a provoca mici hemoragii, care ar împiedica pătrunderea inoculului în derm şi

— prin injecţii intradermice care se practică, de asemenea, după epilare; se prinde pielea între două degete, apoi se introduce acul în derm, paralel cu suprafaţa pielii, injectîndu-se 0,1—0,3 ml; la locul inoculării se formează o bulă de edem.

Inocularea se face cu seringi speciale, prevăzute cu ace fine (5/10 mm).

2. Inocularea subcutanată

Injecţia subcutanată se practică după o prealabilă smulgere a părului şi dezinfectare a pielii cu alcool sau tinctură de iod. Introducerea acului se face în ţesutul celular subcutanat, la baza triunghiului format prin ridicarea pielii cu indicele şi policele stîng.

Cantitatea de lichid care se poate inocula, precum şi locul de elecţie al injecţiei variază după specia animală.

La iepure se pot inocula maximum 30 ml sub pielea flancului sau a coapsei.

La cobai se pot inocula maximum 15 ml sub pielea flancului sau a coapsei.

La şoarece se poate inocula maximum 1 ml sub pielea spatelui.

La şobolan se pot inocula maximum 10 ml sub pielea spatelui.

3. Inocularea intramusculară

Injecţia intramusculară se face prin introducerea bruscă a acului în masa musculară, după o prealabilă smulgere a părului şi dezinfectare a pielii.

Cantitatea de lichid care se poate inocula, precum şi locul de elecţie al injecţiei variază cu specia animală.

La iepure se pot inocula maximum 8 ml în muşchiul coapsei.
La cobai se pot inocula maximum 4 ml în muşchiul coapsei.
La şoarece se pot inocula maximum 0,5 ml în muşchiul coapsei.
La şobolan se pot inocula maximum 5 ml în muşchiul coapsei.

4. Injecția intravenoasă

Tehnica inoculărilor intravenoase variază la fiecare specie animală, în funcție de vena cea mai accesibilă inoculării.

Inocularea intravenoasă la iepure se face cu ușurință în vena auriculară marginală externă, care se găsește sub pielea marginii externe a feței dorsale a urechii.

După imobilizarea animalului se reperează vena, se smulg perii apoi se încearcă punerea în evidență mai bine a venei prin lovirea urechii cu degetul, sau prin aplicarea unui tampon de vată îmbibat în xilol, sau prin comprimarea venei la baza urechii. Se ține urechea între police și index, apoi se puncționează vena cît mai aproape de vîrful urechii; dacă acul se află în venă, în momentul apăsării pe pistonul seringii se observă că lichidul injectat refulează sîngele din venă. Se pot inocula maximum 15 ml de lichid. După terminarea injecției, se scoate acul și se efectuează o compresiune cu un tampon de vată, la locul inoculării, pentru a evita scurgerea sîngelui.

Inocularea intravenoasă la cobai este o operație mai dificilă, deoarece venele sale sînt mai puțin accesibile; în genere inoculările se fac în venele safenă, jugulară externă și internă.

Injecțiile în vena safenă. Cobaiul are o singură venă superficială, vizibilă, la nivelul feței dorsale și interne a coapsei: vena safenă. Prin compresiunea exercitată la baza coapsei se pune mai bine în evidență vena, care se puncționează după o prealabilă smulgere a perilor și dezinfectare a pielii. Cantitatea de lichid care se poate injecta este de maximum 6 ml.

Inocularea în vena safenă se poate practica mai cu ușurință după incizia pielii și denudarea vasului.

Injecția în vena jugulară externă. Vena jugulară externă se află în partea laterală a gîtului, între aponevroza cervicală superficială și mușchiul sterno-cleido-mastoidian. Descoperirea venei se face în felul următor: se practică mai întîi incizia pielii pe linia mediană a gîtului, apoi incizia aponevrozei cervicale superficiale, evitînd lezarea ramurilor venei jugulare anterioare.

Se disecă pe o distanță de 2 cm vena jugulară externă, care apare pe mușchiul sterno-cleido-mastoidian; se puncționează vasul în sens invers fluxului sanguin.

După inoculare, se tamponează vasul, apoi se suturează aponevroza superficială și se închide plaga cu două agrafe.

Inocularea intravenoasă la șoarece și șobolan se face în venele caudale.

Imobilizarea animalului se face cu dispozitivul de contenție descris mai înainte. Venele caudale devin mai evidente după menținerea cozii cîteva minute în apă călduță.

Se apucă extremitatea cozii între policele și indexul stîng, se reperează vena și se puncționează; dacă acul este în venă, nu se simte nici o rezistență în momentul apăsării pistonului seringii și se observă lichidul care refulează sîngele din venă. Cantitatea de lichid care se poate injecta este de maximum 0,5 ml.

Inocularea paravenoasă se percepe prin rezistența pe care o întîmpină pistonul la apăsare și prin albirea tegumentelor; vizibilitatea celorlalte vene dispare, încît inocularea intravenoasă a acelui animal devine deseori imposibilă.

5. Injecția intraperitoneală

Injecția intraperitoneală se practică în același mod la iepure, cobai, șoarece și șobolan.

Animalul se imobilizează ținîndu-l de cap și de labele posterioare așa fel încît să prezinte pentru inoculare fața ventrală.

Inocularea se face în regiunea subombilicală la baza triunghiului format prin ridicarea peretelui abdominal, cuprins între policele și indicele stîng: acul pătrunde în cavitatea peritoneală, traversînd peretele muscular și peritoneal.

Cantitatea de lichid care se poate introduce intraperitoneal variază cu specia animală.

La iepure se pot inocula maximum 40 ml.
La cobai se pot inocula maximum 25 ml.
La șoarece se poate inocula maximum 1 ml.
La șobolan se pot inocula maximum 10 ml.

6. Inocularea intracerebrală

Tehnica inoculării intracerebrale precum și cantitatea care se poate inocula variază de la o specie animală la alta.

Inocularea intracerebrală la iepure și cobai se face după o prealabilă perforare a cutiei craniene cu trepanul. Se imobilizează animalul cu capul fixat pe masă; se reperează punctul de inoculare pe linia care unește unghiul posterior al globilor oculari, paramedian stîng sau drept; se introduce acul în cutia craniană prin orificiul format în prealabil de trepan.

După inoculare se lasă acul pe loc cîteva clipe, pentru a nu se scurge din lichidul inoculat.

Cantitatea de lichid care se poate inocla intracerebral la iepure este de maximum 0,4 ml, iar la cobai, de 0,2 ml.

Inocularea intracerebrală la șoarece și șobolan se face cu o seringă Barthélemy, la care se adaptează un ac special foarte fin, care la 1,5 – 2 mm depărtare de vîrf are peretele mai îngroșat, pentru a nu pătrunde pe o lungime prea mare în masa cerebrală. Peretele cranian fiind foarte subțire, se perforează ușor direct cu acul.

Se așază animalul pe masă, se fixează capul între policele și indexul stîng. Se reperează punctul de inoculare care se găsește pe linia care unește cei 2 globi oculari, la 1 – 2 mm în afara liniei mediane. Se dezinfectează pielea și se introduce perpendicular în cutia craniană. Cantitatea de lichid care se poate injecta la șoarece nu trebuie să depășească 1/20 ml, iar la șobolan 2/10 ml.

7. Inoculările prin căile aeriene

Inoculările prin căile aeriene se fac prin: inhalare, instilaţie intranazală şi prin injecţie intratraheală.

Inhalarea: se introduce capul animalului într-un sac din material impermeabil, sau se introduce animalul într-un recipient în care se pulverizează, cu ajutorul unui suflător, aerosoli încărcaţi cu germeni: animalul se infectează prin inhalarea aerului infectat.

Instilaţia intranazală se face sub o uşoară anestezie: se prinde animalul de muşchii cefii, apoi, ţinîndu-se în poziţie verticală, se instilează cu seringa 2–3 picături de produs virulent în fiecare narină.

Injecţia intratraheală se face, fie direct în trahee, fie după denudarea traheei.

— Injecţia direct în trahee se face în felul următor: în primul rînd se pune în evidenţă traheea prin sprijinirea gîtului animalului pe marginea mesei, se repereazǎ laringele şi se introduce acul în trahee, la 1,5 cm sub laringe; inocularea se face lent; cantitatea de lichid care se poate inocula intratraheal la iepure este de maximum 8 ml, iar la cobai, de maximum 3 ml;

— injecţia intratraheală după denudarea traheei se face în felul următor: se incizează pielea, pe linia mediană, sub cartilajul tiroid; se incizează apoi aponevroza cervicală superficială; se imobilizează laringele între indicele şi policele stîng şi se puncţionează traheea între două inele.

8. Inoculările pe cale digestivă

Inoculările pe cale digestivă se fac prin:
a) contaminarea alimentelor;
b) inocularea prin sondaj stomacal.

Inocularea prin sondaj stomacal constă în introducerea produsului de inoculat direct în stomac cu ajutorul unei sonde.

Inocularea la cobai şi iepure se face cu ajutorul unei sonde uretrale, al cărei pavilion a fost secţionat.

Menţinerea îndepărtată a maxilarelor se realizează prin interpunerea între ele a unei mici planşete dreptunghiulare, din lemn sau din plută, găurită la mijloc. Sonda se introduce 7–8 cm prin acest orificiu. La extremitatea superioară a sondei se adaptează o seringă, cu ajutorul căreia se face inocularea; după inoculare se spală sonda, introducînd în stomacul animalului 2–3 ml ser fiziologic. Inocularea iepurilor prin sondaj stomacal se face cu sonda uretrală nr. 12, iar a cobailor, cu sonda nr.14.

Inocularea la şoarece se face cu ajutorul unei seringi căreia i s-a adaptat un ac, cu vîrful tăiat şi netezit; acul, astfel transformat în canulă, este curbat la unirea dintre treimea superioară cu cele două treimi inferioare, pentru a aluneca mai uşor în spatele limbii.

Se prinde şoarecele de ceafă cu mîna stîngă, iar în mîna dreaptă se ţine seringa; se îndepărtează dinţii animalului cu ajutorul canulei; aceasta se introduce în esofag apoi în stomac; dacă nu se simte rezistenţă în momentul apăsării pe piston, se pot introduce 1—1,5 ml în stomacul şoarecelui.

Apariţia dispneei după introducerea primelor picături indică pătrunderea canulei în trahee.

Prelevările de sînge de la animale

Tehnicile de prelevare a sîngelui diferă nu numai de la o specie animală la alta, ci chiar la aceeaşi specie animală, în funcţie de cantitatea de sînge care trebuie recoltată.

Prelevările de cantităţi mici de sînge se fac prin puncţionarea unei vene superficiale, după tehnica efectuării injecţiilor intravenoase, sau prin secţionarea unui mic fragment de ţesut, dacă vena este greu accesibilă.

Prelevările de cantităţi mai importante de sînge se fac prin puncţie cardiacă.

Puncţia cardiacă la iepure şi cobai. Se imobilizează animalul cu ajutorul unui aparat de contenţie, se smulg perii din regiunea toracică anterioară stîngă, apoi se reperează locul de elecţie al puncţiei.

La iepure locul de elecţie al puncţiei cardiace se află la nivelul celui de-al treilea spaţiu intercostal stîng, la 3 mm depărtare de marginea stîngă a sternului.

La cobai locul de elecţie al puncţiei cardiace se află la nivelul celui de-al doilea spaţiu intercostal stîng, de-a lungul marginii stîngi a sternului, la 1 cm deasupra unghiului cardioxifoidian. Se dezinfectează pielea în regiunea de elecţie a puncţiei şi se introduce acul perpendicular în cutia toracică; în momentul în care se percep bătăile inimii transmise prin ac, se aspiră sîngele cu seringa; se pot face deplasări de cîţiva milimetri ale acului, numai în sens vertical, pentru ca vîrful acului să fie în ventriculul drept.

Aspirarea de bule de aer şi de serozitate sanguinolentă indică pătrunderea acului în parenchimul pulmonar.

Dacă nu se reuşeşte sîngerarea din inimă, după 2—3 încercări, se desprinde animalul de pe aparatul de contenţie şi se încearcă puncţia la alt animal.

Puncţia cardiacă la şoarece şi şobolan. Contenţia şoarecelui şi şobolanului se face prin imobilizarea animalului pe spate pe o planşetă de lemn sau de plută, fixînd membrele anterioare şi posterioare cu ajutorul unor ace, care pătrund în planşetă trecînd prin extremitatea inferioară a membrelor animalului.

Locul puncţiei se reperează după bătăile cardiace; se introduce acul perpendicular, la distanţa de 0,5—1 cm de punctul bătăilor cardiace.

Sîngerările prin puncţie arterială. Cantităţi mari de sînge se pot obţine sîngerînd animalul prin puncţionarea arterei carotidei în traiectul său cervical. Acest mod de sîngerare este frecvent folosit la iepuri. Se poate practica şi la cobai.

Sîngerarea iepurelui prin puncţie arterială. Imobilizarea animalului se face, de preferinţă, cu aparatul Latapie.

După smulgerea părului regiunii anterioare a gîtului şi dezinfectarea pielii, se face o incizie de 7—8 cm pe linia mediană, mai întîi a pielii, apoi a aponevrozei cervicale superficiale, evitînd lezarea ramurilor arterei jugulare superficiale. Se disociază apoi cu sonda canelată fasciculele muşchilor anteriori ai gîtului, reperîndu-se marginea anterioară a muşchiului sterno-cleido-mastoidian. Se descoperă pachetul vasculo-nervos al gîtului, care se află sub marginea anterioară a sterno-cleido-mastoidianului, în unghiul pe care acesta îl face cu traheea. Se disociază cu sonda teaca celulară a pachetului vasculo-nervos, izolîndu-se artera carotidă de venă şi nervul pneumogastric, respectînd ramura laringee a arterei; după denudare pe o distanţă de aproximativ 2 cm se ridică artera carotidă pe sonda canelată.

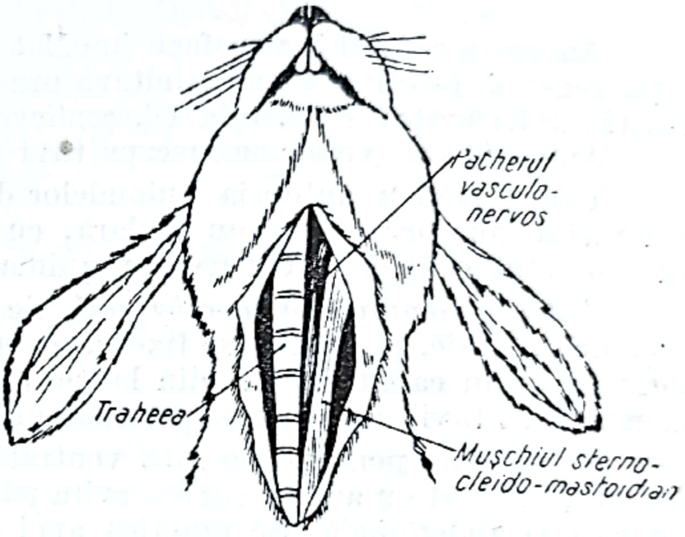


Fig. 63. — Regiunea cervicală anterioară la iepure.

Se taie apoi 3 fire de aţă, avînd fiecare 20—25 cm lungime, care se trec pe sub arteră în felul următor: primul fir se trece sub extremitatea superioară (cît mai aproape de cap) şi se face nod, pentru a întrerupe fluxul sanguin; al doilea fir se trece pe sub extremitatea inferioară a arterei, spre baza gîtului, şi se face un nod slab care nu se strînge decît în momentul declarării unei hemoragii prin lezarea arterei; al treilea fir se trece pe sub arteră în porţiunea sa mijlocie, şi se face, de asemenea, un nod slab.

De obicei, pentru a asigura oprirea fluxului sanguin în timpul puncţiei se aplică o pensă arterială pe arteră la extremitatea sa inferioară de la baza gîtului. Se retrage sonda canelată de sub arteră, se fixează artera pe pulpa indicelui stîng şi se puncţionează vasul în sens invers fluxului sanguin, cateterizîndu-se pe o distanţă de cîţiva milimetri; se strînge apoi nodul firului median pe ac, pentru a asigura menţinerea acului în vas în timpul sîngerării. Se ridică pensa arterială şi sîngele se scurge în recipientul de recoltare.

Puncţia arterială se face cu ajutorul unui ac, mai gros, care este legat de recipientul de recoltare prin intermediul unui tub de cauciuc. Timpul cel mai dificil al acestei tehnici este puncţia arterei; unii autori recomandă introducerea acului printr-o butonieră făcută în prealabil cu un bisturiu foarte fin.

În mod obişnuit, cu ajutorul acestei tehnici se face sîngerarea totală a animalului sau aşa-zisa „sîngerare la alb": se lasă să se scurgă sînge pînă încetează bătăile inimii.

În cazurile în care nu se face sîngerarea totală a animalului, după recoltarea cantității necesare de sînge, se strînge nodul firului plasat spre baza gîtului, se scoate acul din arteră și se secționează vasul între cele două legături; apoi se suturează plaga.

Autopsia animalelor

Autopsia animalelor se face imediat după moarte, deoarece circulația generală este invadată, în cîteva ore după moarte, de germenii din cavitățile naturale: *Esch. coli*, *Cl. septicum*, *Proteus* etc.

Autopsia cadavrelor se face pe tăvi speciale pentru autopsie.

Tăvile pentru autopsia animalelor de laborator sînt confecționate din metal, au forma dreptunghiulară, cu marginile ridicate, prevăzute cu o serie de orificii pentru fixarea animalelor.

Autopsia iepurelui și a cobaiului. Se așază cadavrul animalului pe tava de autopsie, pe spate; se fixează cu ajutorul a 4 fire de sfoară, care se leagă la un capăt de una din labele animalului, iar la celălalt capăt de marginea tăvii, trecîndu-se printr-unul din orificiile acesteia.

Se înmoaie perii de pe fața ventrală a cadavrului cu un tampon de vată, îmbibat cu apă, pentru a evita pătrunderea acestora în cavitatea toracică și abdominală. Se practică apoi incizia pielii de-a lungul liniei submentopubiene, prelungindu-se lateral cele două extremități ale inciziei, urmărind linia axială a celor patru membre.

Se disecă pielea de țesutul celular subcutanat, răsfrîngîndu-se cele două lambouri, la stînga și la dreapta.

Deschiderea cavității abdominale. Se ridică mușchii abdominali cu o pensă, apoi se face pe linia mediană, o mică butonieră, prin care se prelungește incizia de la pubis pînă la apendicele xifoid. Se incizează inserțiile costale și pubiene ale mușchilor abdominali, punîndu-se în evidență conținutul cavității abdominale. Se examinează prezența de revărsate seroase, purulente sau hemoragice, aspectul macroscopic al viscerelor abdominale și se fac prelevările de organe în vederea examenelor microscopice.

Deschiderea cavității toracice. Se secționează bilateral coastele, cît mai aproape de corpul vertebrelor. Punerea în evidență a organelor din cavitatea toracică se face prin ridicarea și răsfrîngerea plastronului costal pe capul cadavrului. Se examinează prezența de revărsare în cavitatea toracică, aspectul organelor și se fac prelevările necesare.

Tehnica însămînțării sîngelui recoltat din inimă. Hemocultura din inimă se face prin puncționarea ventriculului drept, după deschiderea cavității toracice. Se imobilizează vîrful inimii, între capetele unei pense anatomice apoi, cu ajutorul unei spatule de metal, încălzite la roșu, se cauterizează suprafața ventriculului drept. Se introduce în ventriculul drept, prin centrul suprafeței cauterizate, vîrful efilat al unei pipete Pasteur, sterilizate. Se aspiră sînge, imprimînd pipetei mișcări de sus în jos pentru a evita astuparea acesteia cu cheaguri de sînge. Sîngele recoltat se însămînțează pe medii adecvate.

Prelevarea creierului. Se incizează pielea capului pe linia care unește cele două orbite, înconjurînd osul occipital. Se disecă pielea și se răsfrînge pe fața anterioară a capului. Se secționează oasele craniene cu un foarfece mare; osul frontal se secționează între orbite. După înlăturarea calotei osoase se secționează dura mater, apoi se pătrunde cu foarfecele la baza creierului, se secționează nervii cranieni și bulbul. Se scoate creierul și se depune pe o cutie Petri.

Autopsia șoarecelui și a șobolanului. Se așază cadavrul animalului pe o placă de plută sau de asbest, pe spate, cu labele depărtate de corp; fiecare labă se fixează pe placă cu ajutorul unui ac, care străpunge mai întîi laba animalului și apoi placa de plută sau asbest.

Autopsia animalului, prelevarea creierului, precum și hemocultura din inimă se fac urmînd tehnicile descrise la iepuri și cobai.

Alegerea animalelor necesare experimentului biologic

Progresul științelor biologice a dus la o nouă concepție despre animalul de laborator.

Verificarea ipotezelor științifice, prin probe biologice, necesită animale de calitate superioară, cu reactivitate standardizată, care, în condițiuni date, să reprezinte pentru biologist ceea ce substanța „*pro analysi*” reprezintă pentru chimist.

În vederea obținerii unui răspuns biologic, totdeauna, repetabil în condițiuni date, este necesar să se folosească reactivi biologici al căror fond genetic a fost stabilit și uniformizat, în mod științific și a căror condiții de mediu au fost, de asemenea, stabilite, după criterii științifice. Pornind de la aceste considerente, se pot obține, prin creștere științifică, tulpini de animale, cu reactivitate cunoscută, pe baza unui fond genetic uniform, pe mai multe căi:

a) *Creșterea consanguină* care se realizează prin împerecherea soră + frate sau părinte + descendent, cel puțin, în cursul a 20 de generații; în felul acesta se fixează o structură genetică care se manifestă atît în constituția anatomo-fiziologică, cît și în modul de reactivitate al indivizilor. Efectivul de animale, obținut prin creștere consanguină, este destul de greu de menținut deoarece, pe de o parte, scade capacitatea de reproducție iar, pe de altă parte, prezintă o deosebită sensibilitate la modificările condițiilor mediului exterior.

b) *Hibridarea între linii consanguine* oferă posibilitatea obținerii de animale care pe lîngă faptul că prezintă o reactivitate asemănătoare animalelor obținute prin creștere consanguină, prezintă, în plus și o rezistență crescută.

c) *Creșterea în colonie închisă* a unei rase sau tulpini constituie procedeul cel mai larg folosit. Structura genetică a acestor animale variază, dar se păstrează în cadrul colectivității respective.

Aceste animale, prezentînd o reactivitate variabilă, este necesar să se folosească în cercetări un număr cît mai mare de indivizi.

La noi în țară, se cresc, în colonie închisă, diverse tulpini de șoareci: „H”, „R.A.P.”, „Albino Rosso”, „Swiss’, „D.B.A.” etc.; tulpini de șo-

Tehnici generale pentru studiul bacteriilor

Dr. MARCELLA POPOVICI

Pregătirea şi sterilizarea materialului de laborator

Pentru a putea studia şi identifica germenii aparţinînd diferitelor specii microbiene, în raport cu caracteristicile lor (de morfologie, de cultură, de metabolism, de structură antigenică, de patogenitate etc.), prima condiţie este de a-i obţine în cultură pură. Aceasta implică, în primul rînd, necesitatea ca materialul de laborator folosit (recipiente, instrumente, medii de cultură) să fie debarasat de orice element microbian străin, deci să fie steril, iar pe de altă parte, ca orice manipulare bacteriologică să fie efectuată în condiţii de sterilitate, la adăpost de contaminarea cu germeni din mediul înconjurător.

Distribuţia ubicvitară a microorganismelor în stare saprofită sau ca agenţi patogeni, care se găsesc în cele mai variate raporturi ecologice în mediul extern, în cavităţile deschise ale omului şi animalelor, în excretele acestora etc. impune o atenţie deosebită în executarea tehnicilor bacteriologice.

Pe baza acestor considerente se poate afirma că exactitatea şi corectitudinea unui examen bacteriologic sînt condiţionate în mare măsură de modul în care a fost curăţat, pregătit şi sterilizat materialul de laborator.

Cum sticlăria constitue de fapt materialul cel mai mult rulat (folosit) în practica de zi cu zi în laborator, se va insista mai ales asupra pregătirii acestui material.

Curăţirea sticlăriei întrebuinţate. În cazul în care obiectele conţin material infecţios (culturi microbiene sau produse patologice), ele trebuie mai întîi sterilizate prin autoclavare la 120° timp de 30 de minute, iar pipetele păstrate 24 de ore în amestec oxidant sulfocromic. Formula de preparare a acestui amestec este următoarea : se dizolvă la cald 50 g bicromat de potasiu în 200 ml apă distilată. După răcire se adaugă 800 ml apă distilată şi apoi încet 500 g acid sulfuric tehnic.

Amestecul poate fi folosit pînă la oxidarea lui, cînd ia o culoare verde.

Sticlăria scoasă de la autoclav este golită de conţinut (cît timp mediile sînt încă în stare lichidă), după care este spălată cu apă caldă şi săpun, cu praf de curăţat şi perii rotunde speciale, apoi foarte bine limpezită cu apă de robinet şi, în anumite cazuri, chiar cu apă distilată.

Pipetele, după ce au fost scoase din amestecul oxidant, sînt spălate bine la curent de apă. Perlele de sticlă sînt spălate amplu la curent de apă în săculeţ de tifon.

După spălare, materialul este lăsat să se usuce: plăcile Petri, cilindrii gradaţi şi paharele conice, cu gura în jos; eprubetele, pipetele, baloanele, în suporturi speciale sau în coşuri de sîrmă; perlele de sticlă pe hîrtie de filtru etc.

Uscarea materialului se poate face mai rapid prin diferite metode, folosind aer cald, aer comprimat furnizat de un compresor electric etc.

De asemenea, se poate folosi uscarea cu ajutorul unor solvenţi organici, ca alcool, eter etc.

Este necesar ca sticlăria să fie foarte bine uscată, altfel se deteriorează în timpul sterilizării.

Curăţirea sticlăriei noi. Obiectele sînt lăsate cîteva ore pentru degresare şi spălare în amestec sulfocromic sau se fierb în soluţie 1% acid clorhidric. Urmează spălarea şi uscarea obiectelor după metodele descrise mai sus.

Curăţirea lamelor de microscop. Se fierb lamele în apă de robinet cu săpun sau carbonat de sodiu, timp de 30 de minute, după care sînt spălate în apă, păstrate în amestec sulfocromic, pentru degresare timp de 30 de minute şi spălate cu apă de robinet. Se spală apoi cu apă distilată, după care sînt şterse cu tifon, împachetate în hîrtie, în grupe de 10–15 lame, sau păstrate în cristalizor în amestec de alcool şi eter, părţi egale.

Curăţirea lamelelor se face în acelaşi mod.

Materialul, o dată spălat şi uscat, urmează să fie pregătit pentru sterilizare. Spre a feri obiectele de contaminare cu germeni din mediul înconjurător, după ce au fost sterilizate, ele trebuie ermetic acoperite şi împachetate. În acest scop, eprubetele şi baloanele sînt acoperite cu dopuri de vată nehidrofilă, învelite sau nu în tifon. La baloane, în afară de dop se aplică capuşoane de hîrtie legate cu sfoară.

Obiectele cu gura largă sînt învelite în hîrtie şi legate cu sfoară (de exemplu, pahare conice, cilindri, gradaţi, pîlnii, mojare etc.). Plăcile Petri sînt împachetate în hîrtie, separat sau în grupuri. Pipetele gradate sînt acoperite la vîrf în vată, iar la cealaltă extremitate primesc, de asemenea, un dop de vată nehidrofilă. După aceea, fiecare pipetă sau grupuri de 4–5 pipete sînt înfăşurate în hîrtie şi legate cu sfoară. Tampoanele servind la recoltarea exsudatelor se confecţionează pe beţişoare de lemn sau fir de sîrmă, rulînd vata la o extremitate. La cealaltă extremitate (la 2–3 cm de capăt) se înfăşoară cu un dop de vată nehidrofilă, cu care întreg tamponul va fi introdus într-o eprubetă potrivită.

Seringile cu piston de sticlă, necesare la recoltarea sîngelui pentru hemoculturi, după ce au fost bine spălate şi uscate, se montează cu pistonul şi acul prevăzut cu un mandren, după care se introduc în tuburi speciale cu lumen larg şi prevăzute cu un apendice în care intră acul, tuburi care se astupă cu dop de vată nehidrofilă şi capuşon de hîrtie.

În lipsa unor asemenea tuburi se pot folosi şi eprubete de calibru mare, avînd grijă ca acul seringii să fie introdus mai întîi într-un tub mic.

Pentru pregătirea pipetelor Pasteur se taie ţeavă de sticlă în bucăţi de 20–30 cm lungime. Aceste tuburi, spălate la curent de apă şi bine uscate, se şlefuiesc la ambele capete prin încălzire la flacăra forjei, după care în ambele capete se introduc dopuri de vată nehidrofilă. Se împachetează în hîrtie, în grupuri de 50–100 de bucăţi, urmînd ca efilarea pipetelor să se facă după sterilizare.

Perlele de sticlă sînt introduse în flacoane, baloane sau eprubete, care se acoperă apoi cu dop de vată şi capuşon de hîrtie.

Vata şi tifonul se taie în fragmente de dimensiuni variate, după necesităţi, şi se împachetează în hîrtie.

Materialul astfel pregătit urmează să fie sterilizat.

Metode de sterilizare

Prin sterilizare se înţelge acţiunea de distrugere a germenilor microbieni (forme vegetative şi spori).

Moartea bacteriilor poate fi obţinută, aşa după cum s-a arătat, prin agenţi fizici şi prin agenţi chimici.

Folosirea efectelor nocive ale acestor agenţi stă la baza metodelor de sterilizare. Dintre numeroasele procedee recomandate în tehnica bacteriologică sînt întrebuinţate mai ales cele bazate pe acţiunea agenţilor fizici. Întrebuinţarea antisepticelor la sterilizarea materialului de laborator are inconvenientul de a putea împiedica viaţa şi creşterea germenilor în curs de studiu, fiind prin aceasta, cu totul dăunătoare. De aceea metoda de sterilizare prin antiseptice este recomandată în scopuri limitate şi bine determinate, cum ar fi conservarea unor produse biologice, prepararea vaccinurilor şi anatoxinelor, prepararea unor medii de cultură etc.

Printre agenţii fizici cu efecte mortale, atunci cînd acţionează dincolo de anumite limite, cel mai important este căldura.

Moartea bacteriilor prin căldură este rezultatul unor reacţii fizice şi chimice care duc la coagularea substanţelor albuminoide, trecînd printr-un stadiu de denaturare.

Procedeele de sterilizare prin căldură se grupează în două mari categorii, după cum folosesc căldura uscată sau căldura umedă.

Căldura uscată are o putere de pătrundere mai redusă decît cea umedă, fapt care ar putea fi explicat prin diferenţe de coagulabilitate a proteinelor în prezenţa sau absenţa apei.

Metode de sterilizare prin căldură uscată

Sterilizarea prin încălzire la roşu constă în a încălzi pînă la înroşire, în flacăra unui bec de gaz sau a unei lămpi cu alcool, obiectul de sterilizat. Procedeul este foarte simplu, dar este aplicabil numai la sterilizarea unor obiecte de metal – anse de însămînţare, spatule, ace de seringă etc. Înainte de a le pune în contact cu produsul de însămînţat, obiectele trebuie lăsate să se răcească, pentru a nu omorî germenii prezenţi în produsul manipulat. Acest procedeu are inconvenientul că deteriorează, cu timpul, obiectele sterilizate.

Sterilizarea prin flambare se efectuează trecînd rapid şi în mod repetat obiectul de sterilizat printr-o flacără. Procedeul este aplicabil numai la obiecte de dimensiuni mici şi suprafaţă netedă, lipsită de asperităţi, care ar putea proteja germenii (de exemplu: gîtul baloanelor şi eprubetelor, pipete, lame de sticlă etc.).

Sterilizarea la cuptorul cu aer cald (*cuptorul Pasteur, aparatul Poupinel*). De formă cubică, rectangulară sau cilindrică, aparatul este prevăzut cu pereţi dubli. În interior se găsesc rafturi de sită metalică sau tăvi cu fundul perforat, iar în cazul cuptoarelor de formă cilindrică, un coş de sîrmă destinat să primească obiectele de sterilizat. Prin acoperiş, printr-un orificiu, pătrunde, traversînd dopul orificiului, un termometru de 200°, care indică temperatura interioară.

Sub aparat se găseşte sursa de căldură, constînd de obicei din rondele de becuri de gaz. Aparatele mai moderne sînt încălzite cu curent electric. În ambele sisteme, între pereţi circulă aer cald.

În acest aparat se sterilizează obiecte de sticlă, porţelan, hîrtie, vată, instrumente metalice.

Pentru a se obţine o sterilizare completă, este necesar să se menţină obiectele de sterilizat, timp de 60 de minute la 180°.

Modul de funcţionare. Obiectele curate şi perfect uscate, montate şi împachetate, sînt aşezate pe rafturi sau în coş, la distanţă de pereţi, pentru a evita carbonizarea hîrtiei sau materialului de vată. Se închide ermetic aparatul şi se aprinde sursa de căldură. Se urmăresc indicaţiile termometrului, reglînd intensitatea sursei de căldură în aşa fel, încît temperatura o dată ajunsă la 180° să se menţină timp de o oră. Se închide apoi sursa de căldură şi se lasă aparatul să se răcească treptat. Numai cînd temperatura interioară a ajuns egală cu a mediului înconjurător, se scot obiectele. Deschiderea aparatului înainte de răcire duce la spargerea obiectelor din interior, prin diferenţă bruscă de temperatură. În timpul sterilizării, hîrtia şi vata capătă o culoare uşor gălbuie.

În cazul în care temperatura a depăşit 180°, hîrtia sau vata se înnegresc, se carbonizează. Obiectele sterilizate în acest fel nu trebuie să fie folosite. Descompunîndu-se sub acţiunea căldurii, hîrtia şi vata degajează un gudron bogat în substanţe antiseptice, a cărui prezenţă împiedică dezvoltarea bacteriilor. Cînd o asemenea carbonizare s-a produs, obiectele de sticlă trebuie spălate cu alcool, apoi cu apă, uscate şi sterilizate din nou.

Metode de sterilizare prin căldură umedă

Sterilizarea prin încălzire la 100° (fierbere). Este procedeul curent folosit pentru sterilizarea instrumentelor metalice, seringilor, sondelor de cauciuc etc. Obiectele trebuie introduse în vase, acoperite cu apă, preferabil apă distilată, spre a nu depune săruri în timpul fierberii, şi menţinute la această temperatură timp de 30 de minute. Prin acest procedeu sînt distruse doar formele vegetative, în timp ce unii spori rezistă şi dincolo de 100°. Pe de altă parte chiar formele vegetative, cînd sînt protejate de înveliş albuminos, în anumite produse patologice, supravieţuiesc la temperatura fierberii.

Adăugarea în apă a boraxului sau carbonatului de sodiu în concentrație de 4–5% ridică punctul de fierbere al apei peste 100° și, totodată, apără instrumentele, împiedicînd ruginirea lor.

Sterilizarea prin încălzire în vapori sub presiune se realizează cu ajutorul autoclavului. Se sterilizează prin acest procedeu mediile de cultură, produsele patologice, seringile de sticlă, obiectele de cauciuc etc.

Pentru a obține o sterilizare completă, este necesar a se menține obiectele de sterilizat la 115–120°, timp de 20–30 de minute.

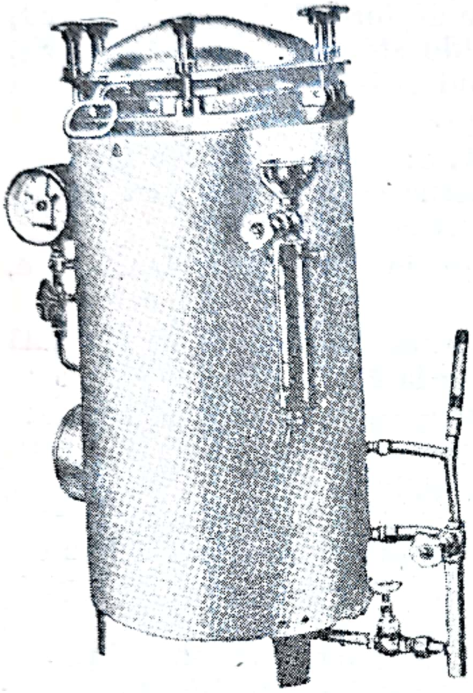


Fig. 64. — Autoclav.

Descrierea aparatului. Autoclavul este un recipient metalic (de cupru), prevăzut cu un capac greu de bronz, care se adaptează prin intermediul unor buloane. Etanșeitatea este asigurată de o garnitură de asbest sau cauciuc. Aparatul este prevăzut cu o supapă de siguranță, cu un robinet de vapori și cu un manometru care indică presiunea în atmosfere, la anumită presiune corespunzînd și un anumit grad de temperatură.

În interior se găsește un trepied metalic înalt de 5–6 cm, pe care se pune un coș sau o găleată în care se așază obiectele de sterilizat. Imediat sub aparat se găsește sursa de căldură, care poate fi constituită din o dublă rondelă de becuri de gaz.

În institute și laboratoare mari, care au generator central de vapori, autoclavele sînt adaptate și folosesc acești vapori.

Aparatul în întregime, inclusiv sursa de căldură, este îmbrăcat la exterior într-un alt înveliș, de obicei de fontă, iar pe partea laterală este prevăzut cu un tub de nivel pentru controlul cantității de apă din interior, precum și un robinet de scurgere pentru golirea apei din cazan.

Mod de funcționare. Se introduce în aparat apă distilată, pînă la înălțimea trepiedului. Deasupra acestuia se așază coșul sau găleata cu obiectele de sterilizat, bine acoperite cu hîrtie, pentru a evita udarea lor prin apa de condensare a vaporilor de pe capac. Se închide capacul cu ajutorul buloanelor (cîte două așezate față în față și în două reprize). Se deschide robinetul de vapori și se aprinde focul cu precauție. Cînd apa începe să fiarbă, vaporii vor ieși prin robinet, întîi întrerupt cu bulele de aer existent în aparat și apoi în jet continuu, șuierînd.

Este necesar să se scoată tot aerul din aparat, deoarece prezența lui ar falsifica datele manometrului. Se închide apoi robinetul de vapori și din acel moment acul manometrului începe să se urce. La presiunea zero, cu robinetul deschis, corespunde o temperatură de 100°. La presiune de jumătate atmosferă corespunde o temperatură de 115°, iar la o atmosferă, 120°.

Vaporii avînd o putere de pătrundere mare, este suficient să se mențină obiectele de sterilizat sub acțiunea lor timp de 20—30 de minute.

Gradul de temperatură variază după calitatea materialului de sterilizat.

Pentru materialele obişnuite, se recomandă, spre a se obține o sterilizare completă (cu distrugerea formelor vegetative şi a sporilor), sterilizarea la 115—120°, timp de 20—30 de minute. Soluțiile zaharoase, glicerina etc. se sterilizează la 110°, dincolo de această temperatură ele fiind caramelizate. Produsele care nu suportă temperaturi mai mari de 100° se sterilizează în autoclavul deschis (cu robinetul desfăcut) şi în condiții speciale, asupra cărora se va reveni mai departe.

Cînd s-a realizat temperatura şi presiunea dorită, se reglează flacăra în aşa fel încît temperatura să rămînă constantă timpul dorit. După aceea se stinge sursa de căldură. Cînd acul manometrului a scăzut la 0, se deschide robinetul de vapori, iar după ce au ieşit vaporii, se deschide capacul şi se scot obiectele.

Deschiderea aparatului înainte de scăderea presiunii produce decompresiune bruscă, cu intrarea în ebuliție şi proiectarea lichidelor din flacoane. Această manoperă este recomandată numai cînd trebuie sterilizate obiecte poroase, ca vată, lînă, care înglobează o mare cantitate de aer ce nu poate fi scoasă din aparat, decît efectuînd cîteva decompresiuni.

Pentru controlul bunei funcționări a autoclavului şi pentru controlul sterilizării se folosesc:

Controale chimice, constînd din utilizarea unor substanțe cu punct de fuziune cunoscut, şi anume: benzonaftolul, cu punct de topire la 110°; antipirina la 114°; floarea de sulf la 115°; rezorcina la 119°; acidul benzoic la 121°. Asemenea substanțe sînt introduse în tubuşoare mici de sticlă, închise la extremități şi aşezate printre obiectele de sterilizat. Pentru a face vizibilă topirea substanței, cînd în autoclav s-a realizat gradul corespunzător de temperatură, se încorporează în aceste substanțe urme ale unui anumit colorant, de exemplu la 100 g substanță, 0,01 g violet de gențiană sau alt colorant.

Controale biologice. Acestea constau din impregnarea unor fire de bumbac sau mătase, cu culturi de germeni sporulați, cunoscînd exact temperatura la care sporii acestora sînt distruşi. Se folosesc în acest scop culturi de *B. antracis*, ai căror spori sînt distruşi la 115° sau *Cl. botulinum* la 125°. Firele impregnate sînt de asemenea introduse în tubuşoare de sticlă, închise la extremități.

Dacă în autoclav s-a realizat temperatura la care sporii sînt distruşi, însămînțările efectuate ulterior nu vor mai fi urmate de dezvoltarea germenilor.

Controale fizice. Acestea se realizează cu termometre înregistratoare.

Manometrul trebuie periodic verificat de serviciul de metrologie, pentru eventuale defecțiuni care ar putea produce înscrieri false ale presiunii din interiorul aparatului.

Metode de sterilizare la temperaturi puțin ridicate

Aceste metode sînt folosite pentru sterilizarea produselor care se deteriorează ușor sub influența căldurii (lichide albuminoase, ser, gelatină etc.).

Pasteurizarea a fost descrisă de Pasteur, care a arătat că se poate înlocui acțiunea rapidă a unei temperaturi ridicate, cu aceea lentă a unei temperaturi mai puțin înalte (55—60°).

Pasteurizarea permite numai distrugerea formelor vegetative. Împiedicarea sporulației se poate efectua prin păstrarea produselor pasteurizate la temperaturi joase.

În raport cu temperatura la care sînt supuse produsele de sterilizat, se deosebesc:

— pasteurizarea joasă, cu încălzire în jurul lui 65°, timp de 30 de minute;

— pasteurizarea înaltă cu încălzire la 80—90°, timp de 1—2 minute;

— pasteurizarea în strat subțire la 91—95°, timp de cîteva secunde.

Pasteurizarea se folosește în special pentru sterilizarea laptelui.

Sterilizarea prin încălzire discontinuă (tindalizare). Această metodă a fost descrisă de către Tyndall și constă în încălzirea produselor de sterilizat la temperaturi puțin ridicate, timp de o oră, trei zile consecutiv.

Mecanismul sterilizării prin tindalizare a primit diferite explicații. După Tyndall, ar avea loc distrugerea formelor vegetative, pe măsură ce ele germinează din spori.

După concepțiile mai noi, ar avea loc degradări progresive în structura bacteriilor, sub influența acțiunii repetate a căldurii.

Tindalizarea se folosește, de asemenea, pentru sterilizarea lichidelor ușor degradabile prin căldură.

Încălzirea se face la o baie de apă la 56—57°. Baia este constituită dintr-un vas cilindric sau rectangular, prevăzută în interior cu dispozitive pentru tuburi și baloane.

Prin capac pătrunde un termometru care indică temperatura interioară. Încălzirea aparatului se face cu ajutorul curentului electric, iar la modelele mai vechi, cu gaz.

Mod de funcționare. Se umple baia 3/4 cu apă distilată și se aprinde sursa de căldură. Se depun materialele de sterilizat și se acoperă baia cu capacul. Se urmăresc indicațiile termometrului. Din momentul în care temperatura apei și a produsului de sterilizat au ajuns la 56—57°, se menține temperatura prin reglarea flăcării (băile electrice au termoregulator) timp de o oră. Controlul temperaturii în interiorul materialului de sterilizat se efectuează punînd la baie un vas asemănător, ca formă și dimensiuni, conținînd apă, a cărei temperatură se apreciază cu ajutorul termometrului. Operația sterilizării este repetată 3 zile consecutiv.

Metode de sterilizare prin filtrare

Anumite lichide nu pot suporta, fără a fi alterate, nici chiar ridicări mici de temperatură. În asemenea cazuri se folosește ca mijloc de sterilizare *filtrarea*, care constă în trecerea lichidului printr-o substanță poroasă care reține microorganismele.

Mecanismul intim al filtrării este constituit dintr-un întreg complex de fenomene fizico-chimice (de capilaritate, de tensiune superficială şi de adeziune moleculară, diferenţă de sarcină electrică, viscozitate etc.), şi nu se datoreşte, aşa cum se credea iniţial, unei acţiuni pur mecanice, de reţinere a bacteriilor în raport numai cu dimensiunile porilor materialului filtrant. Natura lichidului de filtrat, temperatura şi pH-ul acestuia, influenţează adeziunea lui la peretele porilor.

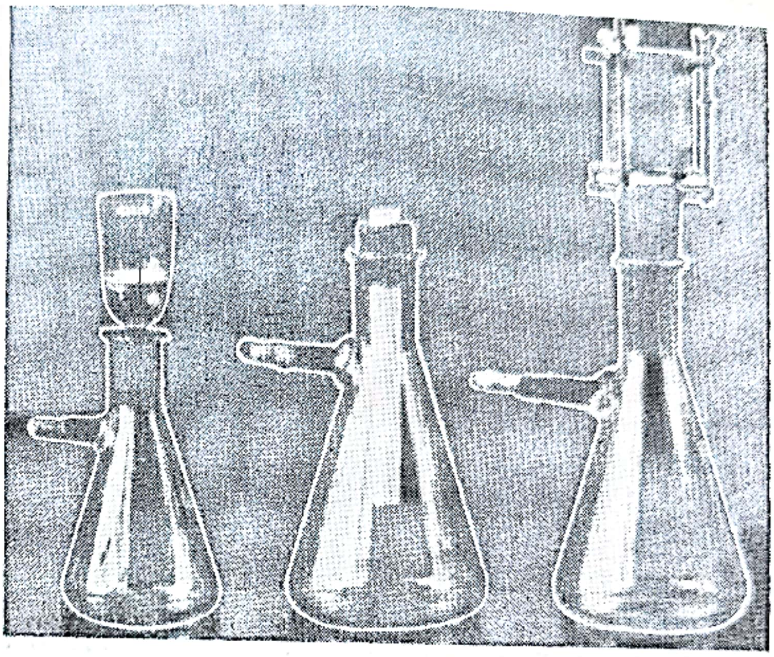


Fig. 65. — Filtre:
stînga — filtru de sticlă Jena; *mijloc* — filtru Chamberland; *dreapta* — filtru Seitz.

În raport cu natura substanţei poroase se cunosc mai multe categorii de filtre:

1. filtre din pămînt de infuzorii — filtrele Berkefeld;

2. filtre de porţelan poros — filtrele Chamberland;

3. filtre de asbest — filtre Seitz;

4. filtre de sticlă — Jena.

Filtrele Chamberland au forma unor lumînări (bujii), închise la o extremitate. Sînt desemnate prin indicativul „L”, care după gradul de porozitate poartă un exponent numeric diferit L_1—L_7 (cel mai grosolan fiind L_1). Bujiile L_3 opresc bacteriile şi sporii lor. Bujia se montează prin intermediul unui dop de cauciuc perforat, la un balon special prevăzut cu tubulură laterală, balon Kitasato.

Trecerea lichidelor de sterilizat prin porii filtrului se face prin aspiraţie realizată cu ajutorul unei pompe de vid, la care se adaptează, prin intermediul unui tub de cauciuc, tubulura laterală a balonului Kitasato, care poartă bujia de filtrat. Înainte de filtrare, bujia filtrantă, împreună cu balonul Kitasato, trebuie spălate şi sterilizate. Pregătirea filtrului se face astfel: se adaptează bujia la balon; cavitatea bujiei, ca şi tubulura laterală a balonului sînt acoperite cu dop de vată şi apoi cu capuşon de hîrtie legat cu sfoară. Aparatul astfel montat este sterilizat prin autoclavare la 115°, timp de 30 de minute.

În momentul întrebuinţării, se adaptează balonul (după îndepărtarea învelişului de hîrtie) la pompa de vid, după care se umectează bujia cu ser fiziologic sau apă distilată, apoi se introduce lichidul de sterilizat. Se realizeză vidul dorit, lichidul străbate porii filtrului şi curge steril în balon. După filtrare se opreşte dispozitivul de vid, se aşteaptă puţin, pentru egalizarea presiunii, se îndepărtează tubul de cauciuc, după care lichidul steril se decantează la flacără, cu pipetă cu bulă. După întrebuinţare, bujiile sînt sterilizate prin autoclavare la 120°, 20—30 de minute, apoi sînt spălate cu peria la curent de apă de robinet şi apoi cu apă distilată. După uscare sînt pregătite pentru sterilizare, care se efectuează prin autoclavare la 120°, 30 de minute.

Din timp în timp, bujiile trebuie verificate pentru permeabilitatea porilor. După uzaj prelungit porii bujiei se obstruează şi bujiile trebuie regenerate (prin autoclavare cu decompresiuni bruşte, prin calcinare sau alte procedee).

Filtrele din asbest pot, de asemenea, avea variate grade de porozitate, fiind desemnate prin indicative diferite : K, EK_1, EK_2 etc.

Placa de asbest se montează pe fundul unei cupe metalice, deasupra unei site de metal, cu ajutorul unor buloane. Cupa se montează apoi, prin intermediul unui dop de cauciuc, la un balon Kitasato, după care se înfăşoară în hîrtie. Aparatele astfel pregătite sînt sterilizate prin autoclavare la 120°, timp de 30 de minute.

În momentul întrebuinţării, se adaptează aparatul la pompa de vid şi se umectează filtrul cu apă distilată sau ser fiziologic, după care se toarnă în cupă produsul de filtrat. Se realizează vidul dorit (25—30 cm mercur) şi lichidul steril trece în balon.

După folosire, cupa purtînd filtrul infect este sterilizată prin autoclavare la 115°, după care este demontat; placa de asbest este îndepărtată, iar piesele sînt spălate cu apă caldă şi săpun. După uscare se montează filtrul cu o placă nouă de asbest.

Filtrele de sticlă Jena au de asemenea diferite porozităţi, cele cu pori mari fiind degrosisoare. Altele reţin corpii microbieni (filtre G5). Manipularea şi mai ales curăţirea lor cere o atenţie deosebită. Pentru a evita îmbîcsirea porilor, după fiecare folosire trebuie fierte în apă distilată şi apoi bine spălate, traversînd prin ele în ambele sensuri, tot cu ajutorul pompei de vid, o mare cantitate de apă distilată.

Mediile de cultură

Viaţa germenilor microbieni este condiţionată de anumite substanţe nutritive pe care le găsesc în mediile de cultură.

— Acestea trebuie să asigure, prin componenţa lor, surse de azot, de hidraţi de carbon, de săruri minerale, de apă, de vitamine şi factori de creştere, necesari creşterii şi reproducerii celulei bacteriene.

— În al doilea rînd, mediile de cultură trebuie să corespundă particularităţilor metabolice ale bacteriilor, ţinînd seama că în timp ce cele aerobe pot folosi oxigenul molecular, cele anaerobe nu se pot dezvolta în prezenţa oxigenului liber, ele folosind doar oxigenul pe care-l iau din mediul de cultură prin diferite procese de desfacere.

—Mediile de cultură trebuie să îndeplinească anumite condiţii de reacţie chimică, în raport cu exigenţele germenilor care se cultivă.

— Ele trebuie să fie sterile şi aşezate în vase ermetic acoperite şi la adăpost de contaminarea ulterioară.

Numărul formulelor recomandate în decursul timpului pentru prepararea mediilor de cultură este imens. Pe măsură ce cunoştinţele asupra particularităţilor metabolice ale bacteriilor s-au adîncit, pe aceeași măsură s-au preparat medii de cultură mai adecvate exigențelor proprii diferitelor specii bacteriene.

Pe baza a diferite criterii privind aspectul și compoziția lor, precum și natura ingredientelor folosite la prepararea lor, mediile de cultură pot fi împărțite în:

— medii lichide și medii solide;

— medii de origine animală, de origine vegetală sau medii sintetice;

— medii uzuale, pe care se dezvoltă cei mai mulți germeni patogeni;

— medii speciale folosite în scopuri bine precizate; printre acestea trebuie menționate:

— medii albuminoase: mediul cu ser coagulat, mediul cu ou, medii conținînd, încorporate la bulion sau la geloză, ser, ascită sau sînge;

— medii diferențiale bazate, fie pe fermentarea hidraților de carbon, fie pe capacitatea de oxidoreducere, fie pe folosirea sărurilor acidului citric ca unică sursă de carbon;

— medii de îmbogățire—medii lichide capabile să favorizeze în mod selectiv dezvoltarea anumitor specii microbiene din produse cu floră asociată;

— medii selective: medii solide de compoziție complexă, care prin substanțele bacteriostatice pe care le conțin inhibează în mod selectiv germenii de floră asociată, iar pe de alta, prin diferite substanțe care favorizează creșterea unor specii patogene, asigură dezvoltarea acestora în bune condiții.

Prepararea mediilor speciale va fi redată la capitolele respective, de Bacteriologie specială.

În capitolul de față vor fi expuse doar conduita generală de preparare a mediilor de cultură, precum și modul de preparare a unor medii uzuale și de largă aplicare în bacteriologie.

Determinarea pH-ului mediilor de cultură

Reacția chimică a mediilor de cultură constituie, așa cum s-a arătat, una din condițiile esențiale care determină valoarea acestora, prin creșterea și multiplicarea bacteriilor. Reacția chimică se apreciază în mod practic prin măsurarea pH. Acest simbol care, după cum se știe, reprezintă logaritmul cu semn schimbat al concentrației de hidrogen ioni a unei soluții sau mediu, indică gradul de aciditate sau alcalinitate actuală a acestora.

Scara de pH, arbitrar stabilită, cuprinde între 0 și 14 toate gradele de reactivitate chimică, de la aciditate absolută (0), pînă la alcalinitate absolută (14), neutralitatea fiind reprezentată prin pH 7 (obținut în raport cu constanta de disociere a apei, care este neutră).

Determinarea și ajustarea pH al mediilor de cultură este absolut necesară, bacteriile putînd trăi numai în anumite limite, uneori destul de strînse și care variază cu specia microbiană.

Dintre metodele recomandate pentru determinarea pH-ului mediilor de cultură, cele mai curent folosite și mai ușor de executat sînt metodele colorimetrice, bazate pe existența unor substanțe colorate—indicatori—care au proprietatea de a prezenta schimbări de culoare, la valori diferite de pH. Metoda electrometrică, foarte precisă, necesitînd o aparatură complicată şi o manoperă laborioasă, este folosită limitat şi numai în cazuri cu totul speciale.

Metodele colorimetrice care au fost recomandate în practica curentă a preparării mediilor de cultură sînt numeroase, ele diferind prin aparatura şi indicatorii de care se folosesc, prin modul de manipulare a acestora, cît şi prin exactitatea indicaţiilor pe care le oferă.

Metoda colorimetrică, folosind scara de etaloame Michaelis. Această scară cuprinde ca indicatori 4 substanţe din seria nitrofenolului : α-dinitrofenol, paranitrofenol, γ-dinitrofenol şi metanitrofenol. Fiecare din aceste substanţe are o zonă de viraj diferită, prezentînd variaţii de culoare în raport cu diferenţe de pH de 0,2. Astfel, zona de viraj a α-dinitrofenolului este cuprinsă între pH 2,8 şi 4,4, aceea a γ-dinitrofenolului între 4 şi 5,4, a paranitrofenolului între 5,4 şi 7, iar a metanitrofenolului, între 6,8 şi 8,4.

Prepararea soluţiilor etalon cuprinde două etape: 1) prepararea soluţiilor-mamă de indicatori şi 2) prepararea tuburilor etalon. Pentru prepararea soluţiilor-mamă, se dizolvă separat cele 4 substanţe în apă distilată, în proporţiile următoare :

α — dinitrofenol	0,100 g+200 ml apă distilată
γ — dinitrofenol	0,100 g+400 ml apă distilată
Paranitrofenol	0,100 g+100 ml apă distilată
Metanitrofenol	0,300 g+100 ml apă distilată

Pornind de la aceste soluţii-mamă, se prepară tuburile etalon. Pentru aceasta se efectuează diluţii 1/10 din soluţiile-mamă. Totodată se pregătesc 35 de tuburi de calibru perfect egal, confecţionate din sticlă neutră de bună calitate.

În aceste tuburi, după spălare riguroasă, şi uscare, se efectuează 4 serii de diluţii crescînde, din cei 4 indicatori, folosind schema redată în tabelul V.

După efectuarea celor 4 serii de diluţii etalon, tuburile sînt închise la flacără, etichetate cu indicaţiile respective de pH şi aşezate într-un stativ special de lemn, prevăzut cu 4 rînduri de orificii, cîte un rînd pentru fiecare serie de indicatori.

Pentru efectuarea determinării pH se foloseşte comparatorul Walpole. Acesta constă dintr-un stativ de lemn prevăzut cu locuri pentru 4 eprubete, aşezate două cîte două, faţă în faţă.

Perpendicular pe direcţia fiecărui cuplu de tuburi, pereţii comparatorului au cîte 2 orificii, prin care pătrund razele luminoase, care după ce străbat conţinutul eprubetelor ajung la ochiul observatorului.

Tehnica. Se repartizează cîte 2 ml din mediul al cărui pH trebuie determinat, în eprubetele 2 şi 4. În eprubeta 2 se adaugă 4 ml ser fiziologic şi 1 ml din indicatorul potrivit. În eprubetele 4 şi 1 se introduc 5 ml şi 7 ml ser fiziologic respectiv. Locul 3 este destinat să primească tubul etalon din scara Michaelis.

Pentru determinarea pH se încearcă diferite tuburi etalon, pînă se obţine o egalitate de culoare cu aceea a mediului încercat, conţinînd indicator (perechea de tuburi 1,2).

pH indicat pe tubul etalon corespunde cu pH mediului.

Tabelul V

1. Seria α-dinitrofenol

Tuburi	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Diluţie 1/10 indicator din soluţia-mamă (ml)	6,7	5,7	4,6	3,4	2,5	1,74	1,20	0,78	0,51
Soluţie 0,1 M carbonat de Na (ml)	0,3	1,3	2,4	3,6	4,5	5,26	5,80	6,22	6,49
pH corespunzător	4,4	4,2	4,0	3,8	3,6	3,4	3,2	3,0	2,8

2. Seria γ-nitrofenol

Tuburi	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Diluţie 1/10 indicator din soluţia-mamă (ml)	6,6	5,5	4,5	3,4	2,40	1,65	1,1	0,71	
Soluţia 0,1 M carbonat de Na (ml)	0,4	1,5	2,5	3,6	4,60	5,35	5,9	6,29	
pH corespunzător	5,4	5,2	5,0	4,8	4,6	4,4	4,2	4,0	

3. Seria paranitrofenol

Tuburi	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Diluţie 1/10 indicator din soluţia mamă (ml)	4,05	3,0	2,08	1,4	0,95	0,63	0,40	0,25	0,16
Soluţia 0,1 M carbonat de Na (ml)	2,95	4,0	4,92	6,6	6,05	6,37	6,60	6,75	6,84
pH corespunzător	7	6,8	6,6	6,4	6,2	6	5,8	5,6	5,4

4. Seria metanitrofenol

Tuburi	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Diluţie 1/10 indicator din soluţia mamă (ml)	5,2	4,2	3,0	2,3	1,5	1,0	0,66	0,43	0,27
Soluţia 0,1 M carbonat de Na (ml)	1,8	2,8	4,0	4,7	5,5	6,0	6,34	6,57	6,73
pH corespunzător	8,4	8,2	8,0	7,8	7,6	7,4	7,2	7	6,8

Cum majoritatea bacteriilor patogene necesită medii în preajma neutralității sau ușor alcaline, indicatorul cel mai folosit este metanitrofenolul (cu zonă de viraj între 6,8 și 8,4).

Ajustarea pH se face cu ajutorul soluțiilor de NaOH 10% și HCl 20% tatonînd cantitățile necesare de adăugat la 2 ml mediu pentru obținerea pH recomandat, și raportîndu-le apoi la întreaga cantitate de mediu.

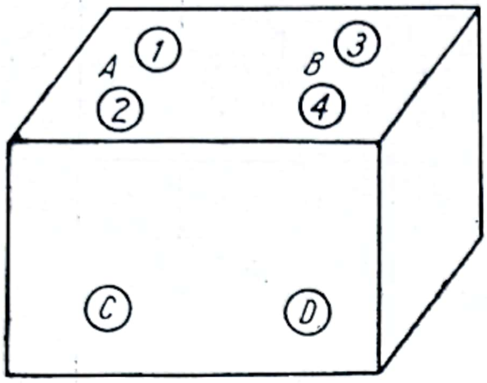


Fig. 66 — Comparator Walpole (schemă).

AB – orificiile prin care pătrunde lumină; *CD* – orificiile prin care privește observatorul.

În cazul mediilor prea intens colorate, tulburi sau conținînd cantități mari de proteine, se recomandă diluarea în prealabil 1/5, ținînd însă socoteala de această diluție la calcularea cantității de indicator necesar a fi adăugată mediului.

În cazul mediilor solide, geloză, gelatină, determinarea și ajustarea pH se efectuează la cald, pentru a evita solidificarea mediilor.

La ajustarea pH a mediilor de cultură, trebuie ținut seama că autoclavarea modifică ușor gradul de ionizare a mediului, obținîndu-se unele scăderi de pH. Acestea de obicei nu depășesc valori de 0,2, fiind mai marcate pentru mediile alcaline. Pentru a remedia acest inconvenient, se recomandă ca înainte de sterilizarea prin autoclavare mediul să aibă un pH superior cu 0,2 celui dorit ca pH final.

Substanțe-tampon. Menținerea unui pH convenabil și constant este o condiție a supraviețuirii culturilor microbiene. Organismele pluricelulare au posibilitatea de a menține un pH constant în limitele necesare vieții, prin elaborarea unor substanțe care, după nevoile momentului, pot să elibereze ioni H sau ioni OH. Asemenea substanțe sînt cunoscute sub numele de substanțe-tampon. Prezența în mediile de cultură a substanțelor-tampon este absolut necesară, ele asigurînd menținerea pH în limite constante. În mediile nutritive, substanțele-tampon provin, într-o oarecare măsură, din extractele de organe și țesuturi, care stau la baza preparării lor. Ele pot fi de asemenea adăugate în momentul cînd se prepară mediul. Printre substanțele cu rol de tampon, curent folosite în asemenea cazuri, sînt fosfații de sodiu și de potasiu.

Metodele de preparare a mediilor uzuale

Bulionul simplu

Ingrediente:

Macerat de carne	1 000 ml
Peptonă	10 g
NaCl	5 g
pH final = 7,4 – 7,6	

Tehnica de preparare. Prepararea maceratului de carne:

1000 g carne tocată, de vită sau cal (curățită în prealabil de tendoane, aponevroze și grăsimi) este macerată la rece 24 de ore în 2000 ml apă de robinet.

Se fierbe apoi timp de 30 de minute, amestecînd din cînd în cînd, după care se filtrează prin pînză. Produsul obţinut este adus, cu apă, la volumul iniţial, constituind maceratul de carne. Acesta poate fi folosit imediat sau poate fi păstrat şi folosit treptat la prepararea a diferite medii. În acest din urmă caz, el trebuie sterilizat prin autoclavare 30 de minute la 120°.

Prepararea bulionului: se dizolvă la cald, în 1000 ml macerat, cantitatea recomandată de peptonă şi de sare, încălzind pînă la fierbere. Se ajustează la pH 8, (pH final 7,4—7,6) folosind NaOH soluţie 10%, după care se autoclavează 30 de minute la 120° pentru precipitarea substanţelor alcalino-teroase. Se filtrează prin hîrtie de filtru, pînă cînd mediul apare limpede, se repartizează în tuburi, sticle sau baloane şi se sterilizează 30 de minute la 115°.

Apa peptonată

Ingrediente:

Apă distilată	1 000 ml
Peptonă	10 g
NaCl	5 g

Tehnica de preparare: se dizolvă peptona şi sarea în apa distilată la cald. Se ajustează mediul la pH 7,6 cu soluţia NaOH 10%. Se autoclavează la 120°, 30 de minute, pentru precipitare. Se filtrează prin hîrtie de filtru. Se repartizează în tuburi şi baloane şi se sterilizează la 115°, 20 de minute.

Geloza simplă

Ingrediente:

Bulion	1 000 ml
Geloză fibre	20 g

Tehnica de preparare: se înmoaie şi se spală geloza, în tifon, la curent de apă timp de cîteva minute, după care se stoarce şi se introduce în bulion la cald. Se agită cu o baghetă pînă la topire. Se aduce mediul la volumul iniţial. Se ajustează la pH 7,6—7,8, cu soluţia NaOH 10%. Se filtrează prin hîrtie de filtru, la cald în autoclavul deschis. Dacă mediul nu este limpede, se clarifică, prin adăugarea, după răcirea lui la 60°, a unui albuş de ou emulsionat în 50 ml apă distilată, după care se încălzeşte la autoclav şi se filtrează în autoclavul deschis, prin hîrtie de filtru.

Se repartizează apoi mediul în tuburi, sticle, baloane, plăci Roux etc. şi se sterilizează 30 de minute la 115°.

Tuburile sînt solidificate drept sau înclinat după nevoie.

Gelatina

Ingrediente:

Bulion	1 000 ml
Gelatină	200 g

Tehnica de preparare: se topeşte gelatina în bulionul încălzit la 80°. Se ajustează la pH 7,4. Se răceşte mediul la 60°. Se clarifică cu albuş de ou, după care se încălzeşte la autoclav la 105—110°, timp de 10 minute.

Se filtrează la cald prin hîrtie de filtru. Mediul limpede este repartizat în tuburi și se sterilizează la 110°, timp de 30 de minute. Tuburile sînt apoi solidificate în poziție dreaptă și păstrate la rece, sub 25° gelatina devenind solidă.

Mediul cu cartof

Se spală cartofii, se curăță de coajă. Cu un cuțit special se taie bucăți de cîțiva cm lungime, avînd o față convexă și una plană. Bucățile sînt păstrate timp de 3 ore într-o soluție 10‰ carbonat de sodiu, după care se spală în 2—3 ape, preferabil apă distilată și se usucă pe hîrtie de filtru. Se introduc apoi în tuburi Roux, care conțin în partea inferioară bulion și care va umecta în permanență extremitatea feliei de cartof.

Tuburile cu mediu sînt apoi sterilizate la 120° timp de 30 de minute.

Serul coagulat

Se recoltează în mod steril sînge din vena jugulară de la bou sau cal.

Sîngele este lăsat să coaguleze și se păstrează la rece timp de 24—48 de ore.

Se decantează în mod steril serul limpede, citrin, repartizîndu-se în tuburi sterile, cîte 8 ml în fiecare tub. Tuburile cu ser sînt apoi așezate în poziție înclinată în etuva Koch, unde serul este coagulat la 80—85°, timp de 2 ore. După solidificare, tuburile sînt incubate 24—40 de ore la 37° pentru controlul sterilității.

Mediul de ou (Dorset)

Ingrediente :

Ouă	9 părți
Apă distilată	1 parte

Tehnica de preparare : după spălarea ouălor cu peria, apă și săpun, păstrarea lor în alcool de 70° timp de 60 de minute și uscarea cojii cu hîrtie de filtru sterilă, se sparg ouăle, străbătînd cu o baghetă de sticlă cele două extremități ale oului și împingînd conținutul într-un cilindru sau pahar conic gradat. Se adaugă apoi apă distilată 1/10 din volumul amestecului de ou. Se omogenizează produsul prin agitare cu bagheta, se filtrează prin tifon steril și se repartizează cîte 7 ml în mod steril în tuburi sterile. Tuburile cu mediu sînt coagulate și sterilizate la etuva Koch prin încălzire la 70°, 2 zile consecutiv în poziție înclinată. Se controlează sterilitatea prin incubare la 37°.

Pentru păstrarea tulpinilor de *Salmonella*, mediul cu ou se prepară adăugînd la 3 volume ou, un volum ser fiziologic 0,85 %.

Coagularea și sterilizarea acestui mediu se fac prin încălzire la 85°, timp de 2 ore, 2 zile consecutiv.

Mediul cu lapte

Se fierbe laptele și se centrifughează 30 de minute la 1500 de ture pe minut, îndepărtînd smîntîna. Se filtrează apoi laptele prin hîrtie de filtru, după care se repartizează în tuburi și se sterilizează la 100°, timp de 60 de minute.

Tuburile sînt apoi incubate la 37°, timp de 24 de ore, pentru controlul sterilității.

Laptele turnesolat se prepară adăugînd în mod steril la mediul cu lapte, soluție apoasă sterilă de turnesol 10%, pînă cînd se obține culoarea ușor violet.

Laptele cu *albastru de metilen* se obține adăugînd în mod steril, la mediul cu lapte, soluție apoasă de albastru de metilen 1/1000, pînă cînd se obține o culoare net albastră.

Bulionul-ser și bulionul-ascită

Se prepară adăugînd în mod steril ser sanguin sau ascită, în proporție de 9 ml bulion, plus 3 ml ser sau ascită.

Bulionul-sînge

Se obține adăugînd în mod steril, la 9 ml bulion, 0,2—3 ml sînge defibrinat, recoltat steril pe perle de sticlă.

Geloza-ser și geloza-ascită

Se prepară adăugînd în mod steril la mediul cu geloză 3%, topit și răcit la 45°, ser sanguin sau ascită în proporție de 9 ml geloză, plus 3 ml ser sau ascită.

Geloza-sînge

Se prepară adăugînd la geloză 2% lichefiată, și răcită la 45°, sînge defibrinat în proporție de 9 ml geloză la 0,5—3 ml sînge.

Geloza lactozată turnesolată (Drigalski)

Ingrediente:

Macerat de carne	1 000 ml
Peptonă	10 g
NaCl	5 g
Geloză	30 g
Lactoză	15 g
Soluție apoasă 10% turnesol	20—60 ml

Tehnica de preparare: Se prepară geloză 3% la pH 7,4 și se sterilizează la 115°, timp de 30 de minute. Se adaugă apoi în mod steril lactoză, în prealabil dizolvată în apă distilată, precum și soluția de turnesol, ambele de asemenea sterilizate la 115°, 30 de minute.

Mediul este apoi repartizat steril în tuburi sau sticluțe și controlat pentru sterilitate prin incubare 24 de ore la 37°.

Tehnici de însămînțare și izolare a bacteriilor

Studiul complex al germenilor microbieni necesită în primul rînd cultivarea lor pe medii nutritive convenabile, precum și obținerea lor în cultură pură. Pentru a obține cultivarea bacteriilor în cultură pură, ele trebuie însămînțate pe medii de cultură.

Tehnici de însămînțare

Însămînțarea unei culturi microbiene sau a unui produs patologic constă în a depune, pe suprafața sau în profunzimea mediilor de cultură, produsul respectiv.

Ustensilele folosite pentru efectuarea unei însămînțări sînt: anse de însămînțare (formate dintr-un fir de platină îndoit sub formă de buclă la o extremitate și montat pe un mîner de metal sau ebonit, la cealaltă), pipete (pipete Pasteur, pipete cu bulă, pipete gradate) sau tampoane.

Operația însămînțării trebuie făcută cu toate precauțiile de asepsie, folosind medii de cultură sterile și instrumente sterile și numai sub protecția unei flăcări (bec de gaz sau lampă cu alcool), spre a se evita introducerea în mediile de cultură a altor germeni decît cei prezenți în produsul însămînțat. Atît recipientele în care se găsesc mediile și produsul de însămînțat, cît și ansa sau pipeta cu care se efectuează însămînțarea trebuie flambate înainte și după terminarea manoperei. Ansa de platină trebuie încălzită pînă la roșu pe toată lungimea firului. După flambare este absolut necesar ca ansa sau pipeta să fie lăsate să se răcească, înainte de a le pune în contact cu produsul de însămînțat, introducerea lor în stare fierbinte realizînd distrugerea germenilor din produs.

Conduita unei însămînțări este următoarea: se flambează ansa sau pipeta și se răcesc cîteva momente. Se deschide apoi recipientul în care se găsește produsul de însămînțat; în cazul eprubetelor sau baloanelor acestea sînt ținute cu mîna stîngă, în timp ce cu marginea internă a mîinii drepte și cu degetul mic se trage și se păstrează dopul, se flambează gura recipientului, se ridică cu ansa sau pipeta o mică cantitate de produs, se flambează din nou și se acoperă recipientul respectiv. După aceasta se deschide și se flambează tubul sau balonul cu mediu, se efectuează însămînțarea, se flambează și se acoperă. După terminarea însămînțării, ansa trebuie din nou încălzită la roșu, iar în cazul cînd s-a folosit pipeta Pasteur, aceasta se depune în amestec oxidant sau se astupă la flacără (un procedeu mai puțin recomandabil).

Tehnici de însămînțare în medii lichide

1. Pornind de la o cultură sau un produs lichid se ridică, cu ajutorul pipetei Pasteur, cîteva picături, care sînt introduse apoi cu precauțiile expuse mai sus, în profunzimea mediului lichid.
2. În cazul în care produsul de însămînțat este o cultură microbiană pe mediu solid sau un produs semisolid, se ia cu ansa o cantitate mică din acesta și se suspensionează în mediul de cultură, omogenizînd amestecul cu ansa pe peretele tubului.
3. Produsele solide (fragmente de organ, produse alimentare etc.) trebuie în prealabil tăiate mărunt cu o foarfecă sterilă și broaiate în mojar cu ser fiziologic sau apă distilată sterilă, după care se ia cu pipeta o mică cantitate, care este introdusă în interiorul mediului.

Tehnici de însămînțare pe suprafața mediilor solide

1. În cazul cînd trebuie însămînțat un produs sau o cultură în mediu lichid, se ridică cu pipeta Pasteur sau cu ansa o picătură din produ-

sul respectiv, după care aceasta este diseminată pe suprafaţa mediului de cultură. Diseminarea se poate face, fie cu ansa, descriind uşor striuri paralele, fie cu o baghetă de sticlă, fie prin înclinarea tubului sau plăcii cu mediu, întinzînd picătura de produs pe toată suprafaţa mediului.

2. În cazul exsudatelor recoltate cu ajutorul tampoanelor, însămînţarea acestora se face chiar cu tamponul, care este şters pe suprafaţa mediului.

3. Cînd produsul de însămînţat este o cultură pe mediul solid, se ia o cantitate infimă cu ansa de însămînţare, după care se întinde pe suprafaţa mediului de cultură.

Tehnici de însămînţare în profunzimea mediilor solide

1. **Însămînţarea prin încorporare.** Se topesc mediile (geloză, gelatină) în baia de apă şi se răcesc la 45°, temperatură care permite viaţa microorganismelor şi la care mediile sînt încă în stare lichidă. Se introduce apoi o picătură din produsul de însămînţat. Se omogenizează amestecul prin agitare, fără a se produce bule de gaz, după care mediile însămînţate sînt lăsate să se solidifice fie direct în tuburile în care se găsesc, fie după introducerea lor în cutii Petri.

2. **Însămînţarea prin înţepătură.** Se efectuează cu ajutorul firului ansei, care după ce a fost încărcat cu produs, serveşte la însămînţarea mediului prin înţepare mai mult sau mai puţin profund.

Însămînţarea germenilor pe oul embrionat este descrisă la capitolul „Rickettsii".

Tehnici de izolare

Izolarea bacteriilor comportă tehnici diferite după cum este vorba de germeni aerobi sau de germeni anaerobi.

Izolarea germenilor aerobi. Obţinerea unui germen în cultură pură se poate efectua prin mai multe categorii de metode.

— Izolare pe medii solide obişnuite, prin diluarea produsului, cu obţinerea de colonii izolate, pornind de la considerentul că o colonie provine dintr-un singur germen.

— Izolare prin însămînţări pe medii speciale de cultură, favorabile dezvoltării numai anumitor specii microbiene.

— Izolare bazată pe diferenţele de comportare a bacteriilor faţă de agenţi fizici, chimici şi biologici.

—Izolare prin metode biologice, folosind animale de laborator.

Izolarea pe medii solide obişnuite, prin diluarea produsului respectiv. Se pot obţine colonii izolate prin:

a) *Metoda diluţiilor succesive.* Într-o serie de 3—4 tuburi cu bulion, se efectuează diluţii succesive din produsul de examinat (se adaugă o picătură de produs la aproximativ 10 ml bulion). Din fiecare tub de diluţie se face apoi o însămînţare pe geloză (în tub sau placă Petri).

Diluarea produsului poate fi făcută şi direct în tuburi cu gelatină sau geloză topită şi răcită la 45°, care după aceea sînt turnate în plăci Petri. În fine, diluţiile pot fi făcute prin treceri succesive în lichidul de condensare al mai multor tuburi cu geloză înclinată, cu răspîndirea ulterioară a acestuia pe toată suprafața mediului de cultură din fiecare tub (prin mișcări de înclinare a tuburilor).

b) *Metoda diseminării produsului pe suprafața mediilor*. Cu ansa se ia o cantitate infimă de produs, care este apoi însămînțată în striuri pe suprafața mai multor tuburi sau plăci cu geloză, pînă la epuizarea completă a produsului.

În cazul în care recoltarea produsului s-a făcut cu tamponul, acesta este însămînțat direct, pe un sector al unei plăci cu geloză; după aceea, cu ajutorul unei baghete de sticlă îndoită în unghi drept, avînd o ramură de lungime egală cu raza interioară a plăcii, printr-o mișcare de rotație, se diseminează produsul pe suprafața plăcii cu mediu.

c) *Metoda de izolare prin micromanipulare*. Este o metodă de finețe, care se execută cu ajutorul micromanipulatorului. Ea constă în izolarea unui germen unic, care urmează să fie însămînțat apoi în mediul de cultură.

Aparatura necesară acestei manopere constă din:

—micromanipulator, care poate fi fabricat de diverse case și care funcționează pe baza a diferite mecanisme;

—microscop, care poate fi folosit și pentru examene pe fond întunecat;

—microinstrumente: microace, micropipete, microscalpele, microanse, microcroșete, microelectrozi, microspatule, microseringi. Multe din aceste microinstrumente sînt confecționate în laboratorul respectiv, cu ajutorul microforjei. Materialele folosite pentru prepararea microinstrumentarului sînt: sticlă, bitum de India, selenium, zinc, cadmiu. staniu. Microforja posedă un microscop așezat în așa fel încît focarul termic să poată fi permanent controlat de acest aparat optic, focarul termic fiind întreținut de un fir încălzit. Lucrările la microforjă cer oarecare dexteritate, care se capătă cu timpul.

—Camere cu ulei, preparate după tehnica Fondbrune, din care se izolează germeni.

Pentru izolarea germenilor, camera cu ulei și toate microinstrumentele trebuie sterilizate în prealabil. În timpul manoperei de izolare cu micromanipulatorul, trebuie respectate cu rigurozitate toate regulile de asepsie. Controlul micromanipulărilor poate fi efectuat după caz, fie luminînd preparația prin transparență, fie cu ecleraj pe fond negru.

Cu ajutorul microinstrumentelor, care diferă de la caz la caz și de la un moment la altul al manoperei, se prinde și se izolează, sub controlul microscopului, cîte un germen, care este apoi introdus într-o picătură de mediu convenabil și ulterior subcultivat. Pentru că se poate întîmpla ca celula bacteriană izolată să fie moartă, este necesar a se însămînța totdeauna un număr mai mare de celule, în picături și tuburi cu mediu diferite.

*

Mediile însămînțate prin una din metodele indicate mai sus sînt incubate la 37° (temperatura optimă de dezvoltare a majorității bacteriilor patogene), timp de 18—24 de ore, după care sînt examinate, notîndu-se aspectul culturilor în medii lichide și pe medii solide.

Printre caracteristicele culturilor în medii lichide, care pot da indicații utile, pe de o parte, pentru indentificarea speciilor microbiene cultivate, iar pe de altă parte asupra eventualelor forme de variabilitate de cultură sînt :

—gradul de tulburare a mediului ; formare de sediment la fundul tubului de cultură ; intensitatea și data apariției sedimentului ; formarea de peliculă la suprafața mediului ; formarea de văl sau de inel aderent de peretele tubului de cultură etc.

— mirosul pe care-l degajează cultura ;

— pigmentarea culturii, felul pigmentului (culoare).

Privitor la aspectul culturilor pe medii solide, numai examinarea coloniilor izolate poate oferi date valabile pentru diagnosticul speciei microbiene, aprecierea formei de cultură și a gradului de disociere microbiană.

Examinarea coloniilor microbiene se face cu ochiul liber sau cu lupa și interesează : forma coloniei ; gradul de opacitate sau transparență ; dimensiunile ; consistența ; aderența la mediu ; caracterul marginilor coloniei ; aspectul suprafeței ; relieful ; culoarea, luciul și eventual, prezența unui halou.

Aspectul macroscopic al coloniilor este condiționat de numeroși factori, printre care : specia microbiană, vîrsta culturii, gradul de disociere microbiană, compoziția chimică a bacteriei, caracterele legate de diviziunea bacteriei, calitatea mediului de cultură (principii nutritive, gradul de umiditate, reacția chimică), temperatura de dezvoltare, acțiunea unor recunoscuți agenți inductori de variante microbiene, cum ar fi substanțele antibiotice, bacteriofagul etc.

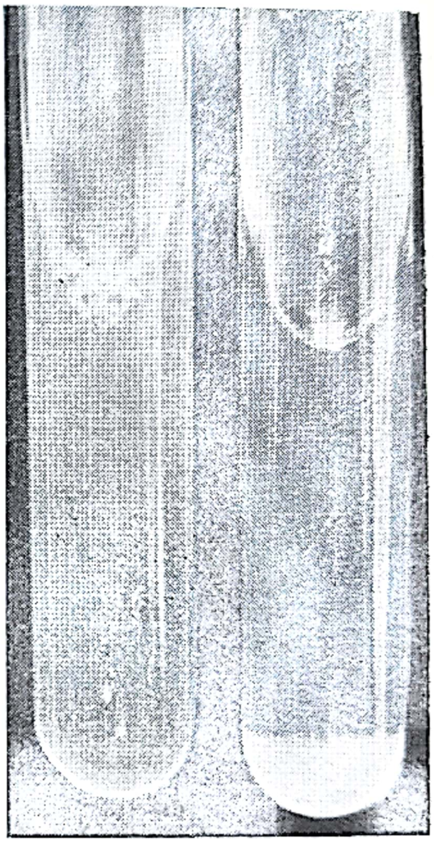


Fig. 67 — Culturi în mediu lichid : *stînga* — cultură forma ,,S'' (tulbură uniform mediul) ; *dreapta* — cultur forma ,,R'' (sedimentează la fundul tubului).

Se recunosc o serie întreagă de variante de cultură, care se deosebesc prin aspectul morfologic al coloniilor, ca și prin aspectul culturilor, în medii lichide.

Forma ,,S'' (*smooth*) dezvoltă colonii rotunde, cu margini regulate, bombate, cu suprafață netedă, translucide, ușor detașabile de mediu și care, suspensionate în soluții saline, produc suspensii omogene. În medii lichide, tulbură omogen mediul. Pentru majoritatea germenilor, forma ,,S'' constituie forma normală, dotată cu calități optime de structură antigenică și de patogenitate.

Forma ,,R'' (*rough*) dezvoltă colonii neregulate, plate, cu suprafața zbîrcită, aderente la mediu, care în soluții saline și în mediul acid produc suspensii neomogene, fenomenul de aglutinare spontană. Însămînțate în medii lichide produc culturi sedimentate, lăsînd clar mediul supraiacent. În afară de cîteva excepții, cum sînt : *B.anthracis*, *M. tubercu-*

losis, *C. diphtheriae*, la care caracterele de patogenitate par să fie legate de forma „R'', în majoritatea cazurilor forma „R'' reprezintă o stare de degradare, însoțită de modificări structurale profunde, de modificări antigenice și de scăderea virulenței.

Între aceste forme extreme, „S'' și „R'' se întîlnesc o serie întreagă de forme intermediare, „S—R'' și „R—S''.

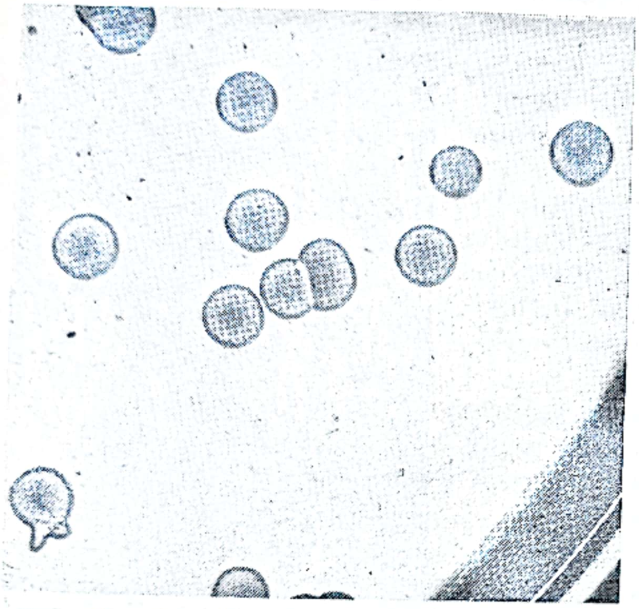


Fig. 68 — Colonii forma „S'' pe geloză (*S. typhi*).

Forma „M'' dezvoltă colonii de consistență scăzută, cu burelet mucos sau cu aspect de picătură de mucus, greu suspensionabile în mediu lichid.

Forma „G'' dezvoltă colonii punctiforme, transparente, abia vizibile cu ochiul liber (colonii pitice), care tulbură slab mediile lichide și au calități antigenice și de patogenitate reduse.

Atît formele „*M*'', cît și cele „*G*'' sau altele, obținute sub influența agenților inductori (colonii uleioase, colonii vitroase etc.) sînt socotite ca variante degradate.

Metode pentru determinarea caracterului „S'' și „R'' al coloniilor

Cultivarea în medii lichide sau pe medii solide (plăci cu geloză 2%) și examinarea culturilor după incubare la 37°, timp de 24 de ore, cu interpretare în funcție de caracteristicile formelor „S'' și „R'', sînt arătate mai sus.

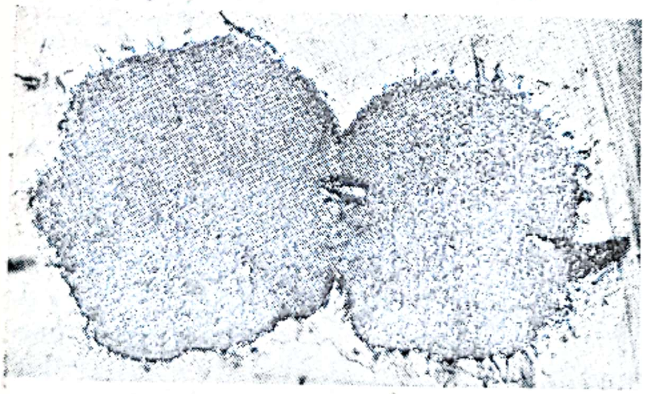


Fig. 69 — Colonii forma „R'' pe geloză (*Esch. coli*)

Comportarea culturii față de soluțiile saline

Se pun în contact diferite concentrații de NaCl : 0,85%, 2,5% și 5%, cu cultura de cercetat (în vîrstă de 24 de ore, obținută pe mediu solid). Pe suprafața unei lame curate se depune cîte o picătură din fiecare din soluțiile de NaCl indicate mai sus. În fiecare din acestea se suspensionează, cu ajutorul ansei de însămînțare, mici cantități din cultura de examinat.

Culturile în formă „S'' produc suspensii omogene, în timp ce coloniile „R'' aglutinează spontan. Testele efectuate cu soluții mai concentrate de NaCl sînt mai sensibile, ele permițînd decelarea unor stadii incipiente de *rough*-izare.

Comportarea culturii față de soluții de tripaflavină

a) *Metoda aglutinării pe lamă* (tehnica Pampana): pe suprafața unei lame curate se depun picături din soluție de tripaflavină 1/500. Cu ajutorul ansei se suspensionează, cu grijă și treptat, în picătura de tripaflavină, o cantitate mică din cultura de cercetat (cultură de 24 de ore pe geloză). Culturile ,,S'' produc suspensii omogene, în timp ce acelea ,,R'' dau suspensii granulate.

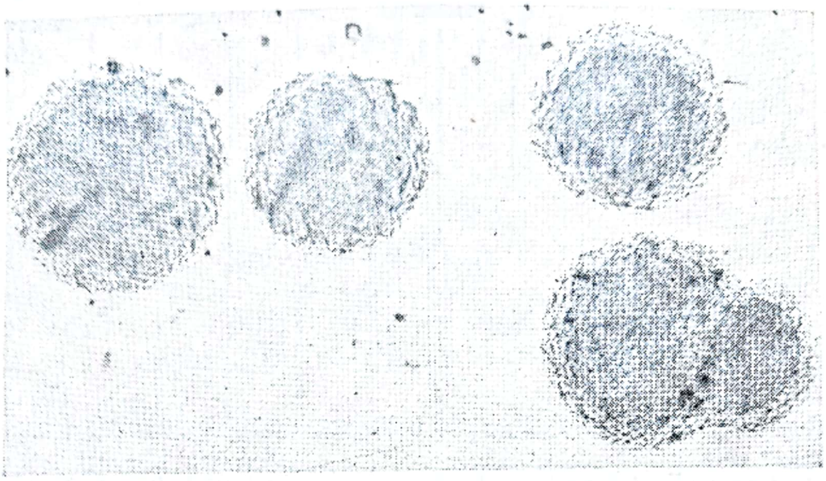


Fig. 70 — Colonii forma ,,R'' pe geloză (*B. anthracis*).

b) *Metoda de aglutinare în tub* (tehnica Dacrio Castelli). Principiul metodei constă în a pune în contact cultura de cercetat cu o soluție de NaCl în diluții crescînde, la care se adaugă o cantitate egală de tripaflavină, soluție 1/250.

Se agită tuburile. Citirea reacției se efectuează după 18—24 de ore la temperatura camerei. Culturile ,,R'' sînt aglutinate rapid și în granule mari, pe o scară largă de diluții, pe cînd cele ,,S'' sînt aglutinate tardiv, în granule mici și numai la concentrațiile mari de NaCl.

Reacția Millon constă în a pune în contact cultura de cercetat suspensionată în apă distilată, cu reactiv Millon, la cald. Culturile ,,S'' produc un amestec opalescent omogen, pe cînd cele ,,R'' produc flocoane care cad la fund și care coagulează sub influența căldurii.

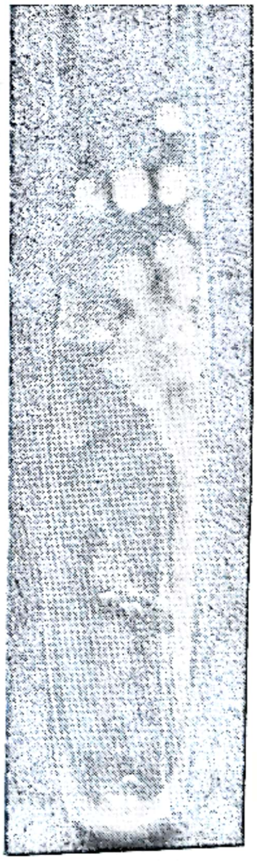


Fig. 71 — Colonii uleioase sub acțiunea bacteriofagului(*Esch. coli* + fag anti-coli).

Prepararea reactivului Millon:

Mercur metalic	o parte (cîntărită)
Acid nitric 36°Be	2 părți (cîntărite)

Tabelul VI

Tehnica reacției de aglutinare în tub în prezența tripaflavinei

Tub	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Apă distilată	—	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
NaCl sol. 16‰	0,5 ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	se aruncă
Tripaflavină 1/250	0,25 ml	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Suspensie din cultura de cercetat în apă distilată	0,25 ml	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

După dizolvare, produsul obținut este diluat cu 2 părți apă, aerat pînă la dispariția mirosului și păstrat în sticlă brună la întuneric.

Dizolvarea mercurului în acidul nitros trebuie să se facă la aer sau în nișe, deoarece dezvoltă nori groși de oxid nitros.

Tehnica reacției. În 2 ml suspensie microbiană din cultura de cercetat (o ansă de cultură pe geloză în vîrstă de 24 de ore, suspensionată în 2 ml apă de robinet), se adaugă 0,2 ml reactiv Millon. Se încălzește în baia de apă, menținîndu-se amestecul 1 minut din momentul cînd apa din baie începe să fiarbă. Citirea reacției se face imediat cu interpretarea indicată mai sus.

Tehnicile de însămînțare și izolare a germenilor anaerobi vor fi expuse la capitolul „Germeni anaerobi".

Izolarea prin însămînțări pe medii speciale. În raport cu caracterele metabolice diferite ale speciilor microbiene s-au recomandat numeroase medii de cultură de compoziție complexă care, punînd în evidență aceste caracteristici, permit separarea speciilor microbiene unele de altele.

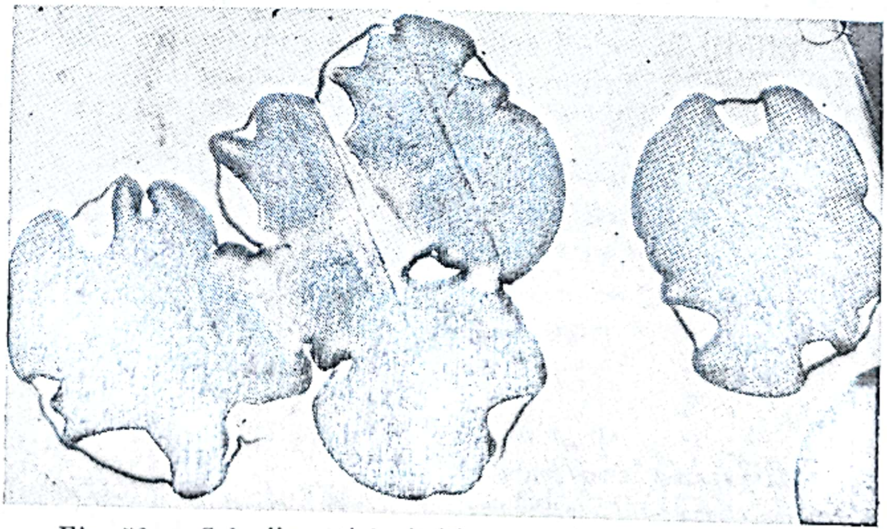


Fig. 72. — Colonii parțial vitrificate obținute sub acțiunea bacteriofagului (*Esch. coli*).

Astfel, folosirea mediilor diferenţiale conţinînd lactoză (exemplu mediul Drigalski), sau lactoză şi zaharoză (exemplu mediul Vogelsang), alături de un indicator colorat, permite diferenţierea germenilor din genul *Escherichia*, capabili să fermenteze lactoza şi zaharoza de cei din grupul *Salmonella* care sînt lactoză şi zaharoză negativ.

De asemenea folosirea mediilor selective, conţinînd substanţe bacteriostatice, permite izolarea unor specii patogene, din produse cu floră asociată, exemplu izolarea *C. diphteriae* pe medii cu telurit de potasiu, izolarea salmonelelor pe mediul Wilson-Blair, a shigelelor pe medii cu săruri biliare etc.

Izolarea bazată pe particularităţi de comportare a bacteriilor faţă de agenţi fizici, chimici şi biologici se efectuează :

— folosind diferenţele de termorezistenţă, de exemplu, separarea enterococului (rezistent la 60°) de alţi coci gram pozitivi, sensibili la această temperatură, sau a germenilor sporulaţi (rezistenţi la încălzire la 80°) de cei nesporulaţi ;

— folosind diferenţele de rezistenţă la agenţi chimici, se poate izola, prin tratare cu hidrat de sodiu, *M. tuberculosis* în stare pură, dintr-un produs cu floră asociată ;

— folosind toleranţa unor germeni faţă de unele substanţe chimice, de exemplu, izolarea stafilococului pe medii hiperclorurate sau a clostridiilor patogene pe medii cu fenol ;

— folosind acţiunea selectivă a antibioticelor, se pot izola dintr-un produs cu floră asociată germeni rezistenţi la antibioticul respectiv, exemplu izolarea *H. pertussis* pe mediul Bordet-Gengou, conţinînd penicilină.

Izolarea prin metode biologice se bazează pe receptivitatea particulară a unor animale de laborator faţă de unele specii microbiene. Alegerea animalelor celor mai sensibile faţă de specia microbiană suspectată şi inocularea lor pe cale subcutanată permite izolarea germenului respectiv, din produsele patologice cu floră asociată. Astfel, pentru izolarea pneumococului din spută se procedează la inocularea la şoarecele de 16 — 20 g, pe cale subcutanată, a unei cantităţi de 0,5 ml din produsul fluidificat în prealabil cu ser fiziologic. În primele 24 de ore şoarecele sucombă cu septicemie şi prin hemocultură se izolează pneumococul în stare pură.

Pe acelaşi principiu se bazează izolarea *M. tuberculosis* din produse patologice, prin inocularea produsului pe cale subcutanată, la cobai.

Detalii asupra tehnicilor de izolare prin metode speciale sînt indicate la capitolele respective de Bacteriologie specială.

Metode de conservare a bacteriilor

Bacteriile pot conserva vitalitatea lor în culturi perioade de timp variabile în raport cu specia microbiană, cu calitatea mediului de cultură, cu temperatura etc.

Cum moartea bacteriilor, la un moment dat, se datoreşte, pe de o parte, epuizării substanţelor nutritive, iar pe de alta, acumulării de metaboliţi cu acţiune nocivă, este necesar ca în mod periodic bacteriile să fie subcultivate pe medii proaspete.

Intervalul de timp la care trebuie trecute culturile pe medii noi, cît şi alegerea mediilor potrivite trebuie să corespundă particularităţilor biologice ale speciei microbiene considerate. Astfel, dacă germenii din familia *Enterobacteriaceae* se păstrează pe geloză moale 1%, necesitînd subcultivări la intervale de 2 luni, streptococii se păstrează în bulion-sînge de cal, cu treceri la 3 luni, *C. diphtheriae* pe ser coagulat sau pe geloză, cu subculturi la 1 lună interval, vibronul holeric pe geloză alcalină, iar germenii anaerobi în mediu Vf, cu treceri la 1—3 luni.

Deoarece prezența zaharurilor în mediile de cultură determină procese de fermentație cu producere de acizi dăunători pentru viața bacteriilor, se recomandă, pentru conservarea acestora, medii lipsite de zaharuri.

Un alt factor care condiționează păstrarea culturilor microbiene este temperatura.

În genere, bacteriile se conservă perioade mai lungi de timp dacă sînt păstrate la temperaturi joase, la frigider.

Lumina solară exercitînd o acțiune vătămătoare asupra germenilor microbieni, se recomandă conservarea culturilor la întuneric.

În fine, un alt factor cu acțiune nocivă, de care trebuie să se țină seama în păstrarea culturilor microbiene, este uscăciunea.

Prin ferirea culturilor de uscăciune se prelungește intervalul de timp la care trebuie subcultivate. Acoperirea ermetică a tuburilor de cultură se poate realiza prin folosirea dopurilor de cauciuc sau plută, sterilizate în prealabil, sau a dopurilor de vată arse și înfundate, la care se adaugă parafinarea sau acoperirea cu foi de staniol, de gutapercă ori alt material impermeabil.

Subculturile efectuate la intervale prea scurte de timp au inconvenientul de a antrena diferite modificări ale caracterelor de metabolism și patogenitate, îndeosebi scăderea virulenței.

Pe de altă parte, există unele specii microbiene care fiind extrem de sensibile la acțiunea agenților de mediu extern, nu pot fi păstrate în culturi, durata de supraviețuire a acestora fiind foarte scurtă.

În asemenea cazuri, cît și pentru a asigura păstrarea integrală a caracteristicilor celulei bacteriene, se recurge la conservarea prin *liofilizare*. Principiul acestei metode constă, așa după cum s-a mai arătat (vezi capitolul „Comportarea față de agenții fizici"), din uscarea prin sublimare a substanțelor organice, după prealabilă congelare, trecerea directă a apei din starea solidă în stare de vapori, permițînd păstrarea arhitectonicii celulare.

Conservarea prin liofilizare se bazează pe întreruperea proceselor vitale, structura proteinelor celulei bacteriene rămînînd nealterată.

Repuse într-un mediu favorabil, celulele se rehidratează și își reiau funcțiile metabolice, întrerupte în momentul liofilizării.

Kolesov și alți autori sovietici obțin, după ani de zile, o viabilitate de 40—60%, cu păstrarea tuturor proprietăților de cultură, biochimice, de structură antigenică și de virulență a tulpinilor de germeni.

Procesul de liofilizare se efectuează în următorii timpi :

Culturi tinere, obținute pe medii optime, sînt spălate prin centrifugare cu ser fiziologic sau un mediu de protecție de natură coloidală.

Ca medii de protecţie se folosesc : laptele, peptona, gelatina, serul sanguin etc., care au rolul de a proteja celula bacteriană de agenţii vătămători care sînt frigul şi uscarea. Urmează congelarea la temperaturi sub —20° şi uscarea în stare congelată în vid de cel puţin 1/10 mm Hg, pînă la obţinerea unei umidităţi reziduale de 0,5—1,5—2%. Culturile liofilizate sînt păstrate apoi în vid, la +4° sau temperatura camerei.

Diferitele aparate de liofilizare existente diferă prin si temul de captare a vaporilor produşi prin evaporare în timpul uscării şi prin felul cum fiolele conţinînd produsul de liofilizat sînt adaptate la sistemul de liofilizare.

Pentru a fi recultivate pe medii nutritive, culturile microbiene liofilizate sînt mai întîi suspensionate în bulion, sau ser fiziologic, şi apoi cultivate pe medii de elecţie.

Recoltarea produselor în vederea examenelor bacteriologice

Dr. MARCELLA POPOVICI

Rezultatele examenelor bacteriologice depind în mare măsură de condițiile în care au fost recoltate produsele de examinat, de modul în care au fost transportate și păstrate, precum și de intervalul de timp care a trecut din momentul recoltării pînă la efectuarea examenului.

Alegerea produselor care trebuie recoltate se face după indicațiile clinice și epidemiologice, în raport cu particularitățile biologice ale agentului patogen suspectat, cu căile de pătrundere și de eliminare din organism, cu perioada și situația în care se găsește individul examinat (diferitele perioade de boală, convalescență, stare de purtător, contact etc.).

O serie de reguli cu aplicabilitate generală pentru toate produsele stau la baza tehnicilor de recoltare, printre care :

— Folosirea de instrumente și recipiente în prealabil sterilizate numai prin agenți fizici. Substanțele chimice trebuie evitate, urme din asemenea substanțe putînd împiedica dezvoltarea microorganismelor eventual prezente în produsele recoltate.

— Recipientele în care s-au recoltat produsele trebuie ermetic închise, pentru a se evita, pe de o parte, suprainfectarea produselor cu germeni proveniți din mediul înconjurător, iar pe de alta, pentru a nu răspîndi în jur microbi patogeni eventual existenți în produsele de examinat.

— Produsele trebuie corect etichetate și însoțite de o fișă completă cuprinzînd : numele și pronumele bolnavului, data și ora recoltării, proveniența produsului, examenul cerut, diagnosticul clinic probabil, unele date anamnestice privind mai ales vaccinarea specifică și unele infecții anterioare înrudite, precum și date asupra tratamentului cu sulfamide și antibiotice, administrat eventual înainte de recoltarea produsului.

— Produsele trebuie să fie transportate în condiții de refrigerare, la adăpost de raze solare, uscăciune și alți agenți cu acțiune dăunătoare asupra microorganismelor. În cazul produselor cu floră asociată, se folosesc diferite lichide conservante, care, prin conținutul lor în substanțe bacteriostatice, substanțe-tampon, etc. au rolul de a opri în dezvoltare flora saprofită, lăsînd nestingherită supravieţuirea sau chiar favorizînd dezvoltarea germenilor patogeni.

— Examenul bacteriologic trebuie să fie efectuat la interval cît mai scurt de momentul în care a fost recoltat produsul.

Recoltarea sîngelui pentru hemocultură. Manopera comportă condiţii riguroase de asepsie, folosind o seringă de 10—20 ml, sterilizată în prealabil. Este preferabil să se întrebuinţeze o seringă cu piston de sticlă (Luer), care poate fi sterilizată împreună cu pistonul şi acul montat, în tuburi port-seringă (vezi „Pregătirea şi sterilizarea materialului de laborator").

În cazul în care nu există posibilitatea de a se steriliza seringa la autoclav sau cuptorul Pasteur se poate folosi (cu rezultate mai puţin bune) o seringă fiartă 20—30 de minute, în vas acoperit.

Se recoltează sîngele din vena plicii cotului, după strîngerea braţului cu un garou şi aseptizarea prealabilă a regiunii, prin badijonare cu alcool şi tinctură de iod. Pentru a reduce la minimum riscurile infectării produsului cu germeni din aer, persoana care efectuează recolta trebuie să ţină încă seama de o serie de reguli :

— să nu încerce permeabilitatea acului trăgînd aer în seringă ; acul trebuie sterilizat cu mandren, care va fi tras afară cu precauţia de a nu atinge vîrful acului ;

— să nu palpeze vena după aseptizarea regiunii, sau, dacă acest procedeu este strict necesar, să-şi badijoneze cu alcool şi tinctură de iod degetul arătător cu care palpează.

După puncţionarea venei, se trage în seringă o cantitate de 10—20 ml sînge, după care se desface garoul, se scoate acul din venă, aplicînd un tampon cu alcool la locul înţepăturii. La adăpostul unei flăcări (lampă cu alcool, bec Bunsen etc.), se însămînţează sîngele din seringă în unul sau două flacoane conţinînd mediile de cultură, după care flacoanele sînt flambate şi acoperite. Cantitatea de sînge care se însămînţează trebuie să reprezinte numai 1/10 din volumul mediului de cultură pentru a evita efectele bactericide ale alexinei prezente în sîngele însămînţat. Pentru a micşora şi mai mult riscurile infectării produsului în momentul recoltei, se poate folosi, în loc de seringă, un aparat de sîngerare constînd dintr-un balon cu mediu de cultură în care, prin dop, pătrunde un tub de sticlă. La extremitatea exterioară a tubului de sticlă este adaptat un tub de cauciuc, care la cealaltă extremitate poartă acul. Acesta este sterilizat cu mandren, într-un tubuleţ de sticlă, înfăşurat ermetic în hîrtie.

Puncţionînd vena cu acul, sîngele va curge direct în balonul cu mediu, realizînd astfel un sistem închis, în care produsul este lipsit de orice contact cu exteriorul.

După ce s-a extras cantitatea necesară de sînge, se scoate acul, aplicînd tamponul de vată la locul înţepăturii. Imediat după aceea, la adăpostul unei flăcări se îndepărtează montura balonului, inclusiv dopul, care este înlocuit cu un alt dop, ce se găseşte împachetat în hîrtie şi legat de gîtul balonului şi care a fost sterilizat o dată cu acesta.

Recoltarea lichidului cefalorahidian se efectuează prin puncţie rahidiană, de obicei la nivelul spaţiului dintre L_4 şi L_5. Se iau aceleaşi precauţii de asepsie ca cele expuse la recoltarea sîngelui pentru hemocultură.

Bolnavul este așezat pe scaun sau pe marginea patului, iar în cazuri de meningită, culcat lateral, cu coloana vertebrală îndoită, pentru a se obține evidențierea spațiilor intervertebrale. Se va sprijini bolnavul în tot timpul manoperei. Se efectuează aseptizarea largă a regiunii dorso-lombare prin badijonare cu alcool și tinctură de iod. Se procedează la puncție cu ajutorul unui ac lung de aproximativ 8 cm, care a fost sterilizat în prealabil cu mandren adaptat. După pătrunderea acului în spațiul subarahnoidian, se scoate mandrenul și se colectează lichidul (cam 5—8 ml) într-o eprubetă sterilă.

După terminarea recoltării, se astupă în mod steril eprubeta cu dopul de vată, se scoate acul și se aplică pe locul înțepăturii un tampon cu alcool.

După puncție, bolnavul este menținut culcat cu fața în jos, fără pernă, cîteva ore (minimum 1—2 ore). Lichidul extras trebuie însămînțat cît mai curînd posibil, în medii de cultură potrivite, după care se efectuează celelalte examene.

Recoltarea urinii pentru urocultură. 1. La femei, urina se recoltează în mod steril, cu sondă de cauciuc sau sondă metalică, sterilizate în prealabil (prin fierbere sau autoclavare).

Femeia se așază în poziție ginecologică, i se face toaleta vulvei și tamponarea regiunii meatului urinar cu ser fiziologic steril și i se introduce cu atenție sonda în uretră. Se lasă să curgă primele picături, după care urina se colectează într-un balon steril. După recoltare, se retrage sonda cu grijă.

2. La bărbați, recoltarea urinii se face în modul următor: după toaleta glandului și tamponare cu ser fiziologic steril, se lasă să curgă primele picături, după care se colectează urina într-un vas steril (pahar conic sau balonaș cu gura largă), care este apoi imediat acoperit.

La bătrînii prostatici se recomandă recoltarea urinii cu ajutorul unei sonde de cauciuc Nelaton (nr. 16—17), sterilizate în prealabil prin fierbere.

Recoltarea sputei se efectuează de preferință dimineața, pentru a se obține în proba de examinat secrețiile bronșice acumulate în timpul nopții.

După o prealabilă gargară cu ser fiziologic, bolnavul este invitat să tușească și să expectoreze într-o cutie Petri, pahar conic, cristalizor cu capac etc. Recipientele în care se recoltează sputa trebuie bine spălate, uscate și preferabil sterilizate prin căldură. Ele nu trebuie să conțină nici un fel de urmă de substanțe antiseptice.

Produsul o dată recoltat, trebuie transportat la laborator în vas închis și însămînțat cît mai curînd posibil, pentru a se evita dezvoltarea germenilor de asociație. Dacă însămînțarea nu se poate face imediat, sputa trebuie păstrată la frigider.

În cazul copiilor mici, care înghit sputa, se folosește pentru examen produsul obținut prin spălătură gastrică.

Recoltarea exsudatelor rino-faringiene se efectuează cu ajutorul unor tampoane de vată nehidrofilă montate pe bețișoare de lemn. Pentru recoltarea acestor produse de la copii mici, se folosesc tampoane foarte subțiri, montate, de preferință, pe fir de sîrmă. Tamponul este introdus în eprubetă, traversînd dopul de vată, și este sterilizat prin căldură uscată, la 180°, timp de 60 de minute.

Pentru recoltarea exsudatelor amigdalo-faringiene se procedează astfel : se deschide gura bolnavului, care este așezat cu fața către o sursă de lumină, se apasă limba cu un apăsător de limbă sau coada unei lingurițe și se șterge cu tamponul suprafața amigdalelor sau faringelui, în așa fel, ca să se ridice eventualele false membrane ce s-ar găsi la acest nivel și care deseori sînt aderente.

După întrebuințare, apăsătorul de limbă trebuie flambat sau dezinfectat prin depunerea lui într-un pahar cu soluție de sublimat 1°/₀₀.

Pentru a evita eventualele picături de spută pe care bolnavul le poate emite prin tuse sau reflex de vomă, persoana care efectuează recoltarea trebuie să nu se așeze în fața bolnavului, ci puțin lateral.

Recoltarea produsului se va face la distanță de mese, gargară sau toaleta gurii.

La copii mici, recoltarea este mai dificilă, din care cauză sînt necesare diferite manevre speciale, ca : apăsarea obrajilor în dreptul molarilor, pensarea nasului sau chiar folosirea unui depărtător bucal.

Tamponul conținînd produsul trebuie examinat cît mai curînd după recoltă, pentru a evita uscarea acestuia.

Recoltarea exsudatului nazal se face prin ștergerea, cu ajutorul tamponului, a suprafeței interioare a narinelor.

Recoltarea materiilor fecale se face în raport cu perioada de boală, convalescență sau stare de purtător și agentul cauzal suspectat, fie din scaunul spontan emis, fie prin clismă, fie după administrare de purgativ salin.

Recoltarea materialului se face în colectoare speciale, constînd dintr-un tub de sticlă astupat cu dop de plută care, la rîndul lui, poartă o linguriță de metal. Tubul de sticlă este protejat de o cutie de lemn sau de metal.

În lipsa colectoarelor se pot folosi cutii Petri, borcănele de sticlă sau flacoane de penicilină. Bolnavul este invitat să defece în vase smălțuite, opărite în prealabil cu apă fiartă și cu ajutorul linguriței colectorului se ridică produsul, după omogeneizarea lui.

Colectoarele trebuie sterilizate înainte de recoltarea produsului. Se va evita folosirea de substanțe antiseptice.

Cantitatea necesară de produs, în vederea examenelor bacteriologice, este de 2—3 g (cam cît un degetar).

În cazul în care se bănuiește prezența germenilor din grupul *Shigella*, produsul de examinat se poate recolta și cu ajutorul unei sonde de cauciuc (sondă Nelaton nr. 16).

Cînd produsul trebuie transportat la distanță și examinarea lui nu se poate executa în interval de cîteva ore, se recomandă folosirea unui lichid conservant care inhibează flora saprofită, permițînd și chiar favorizînd, în același timp, dezvoltarea celei patogene.

Condiții speciale de recoltă și conservare vor fi expuse pe larg la capitolele respective de bacteriologie specială.

Materialul recoltat trebuie transportat la laborator în condiții de refrigerare și examinat cît mai curînd după recoltă.

Recoltarea bilei se face cu ajutorul sondei Einhorn, sterilizată în prealabil prin autoclavare sau fierbere prelungită. Se procedează la clătirea gurii cu ser fiziologic sau apă fiartă şi răcită, după care se introduce sonda, urmînd peretele posterior al faringelui. Prin mişcări de deglutiţie, sonda ajunge în esofag. Se recomandă pacientului să respire liniştit şi cînd sonda ajunge în stomac, se culcă bolnavul în decubit lateral drept. În interval de 1—3 ore, sonda pătrunde apoi în duoden. Cu ajutorul unei seringi adaptate la extremitatea sondei, se aspiră aproximativ 10 ml bilă, care sînt introduşi în mod steril într-o eprubetă sterilă. Pătrunderea bulei olivare în duoden poate fi dirijată sub controlul unui aparat Röntgen.

O dată recolta terminată, se introduce cu seringa în sondă o cantitate de aproximativ 10 ml apă, pentru a îndepărta lichidul duodenal rămas în tub şi care produce, în timpul retragerii sondei, o senzaţie neplăcută de amărăciune. Se trage apoi încet sonda. Cînd ea a ajuns în faringe, se recomandă efectuarea unor mişcări de deglutiţie, în timp ce se extrage complet sonda.

Recoltarea puroiului din colecţii închise se efectuează după aseptizarea tegumentelor prin badijonare cu alcool şi tinctură de iod, după următoarele metode :

— *Prin puncţie.* Cu ajutorul unei seringi sterile se extrage o cantitate de puroi, care este introdus în mod steril într-o eprubetă sterilă.

— *Prin aspiraţie.* Cu o pipetă Pasteur, fie traversînd tegumentele destinse, fie prin introducerea ei pe traiectul unui abces fistulizat, fie cu ocazia unei intervenţii chirurgicale, produsul este trecut de asemenea într-o eprubetă sterilă.

Recoltarea puroiului din plăgi deschise se face cu ajutorul pipetei Pasteur, pe meşe de tifon sau cu tampoane sterilizate în prealabil.

Recoltarea secreţiilor uretrale şi vaginale. La bărbat, recoltarea secreţiei uretrale se face cu ajutorul unei anse de platină dimineaţa, înainte de urinare. Cînd secreţia este în cantitate foarte mică, se examinează sedimentul urinar.

La femeie, recoltarea secreţiilor vaginale, uretrale sau din colul uterin se face direct din puroiul care se scurge din uretră sau din col, tot cu ajutorul ansei.

Recoltarea secreţiilor conjunctivale. Cu ajutorul unei pipete Pasteur sterile sau a unei anse de platină flambată şi răcită în prealabil, se prelevează o picătură de secreţie cu care se fac însămînţări pe medii de cultură potrivite şi o altă picătură cu care se confecţionează mai multe frotiuri.

Recoltarea serozităţilor la nivelul şancrelor.

1. *Şancrul sifilitic.* Recoltarea produsului trebuie efectuată numai la laborator. Se şterge suprafaţa leziunii cu un tampon de tifon îmbibat în apă distilată sau ser fiziologic (cu precauţie, pentru a nu produce sîngerarea ulceraţiei). Apoi, cu ajutorul unei pipete Pasteur efilate, se recoltează cîteva picături de serozitate, raclînd uşor suprafaţa şi mai ales marginile leziunii.

Dacă ulceraţia sîngerează, se şterge din nou cu un tifon uscat şi se repetă operaţia. Se depun apoi picături de serozitate recoltate pe suprafaţa unor lame curate şi degresate. Pentru examenul microscopic pe fond întunecat se amestecă, cu ajutorul unei pipete Pasteur, picătura de serozitate cu o picătură de ser fiziologic. După amestec se trece imediat la examinarea preparatului.

Pentru confecționarea frotiurilor colorate, serozitatea este întinsă pe lamă. După uscare, frotiurile sînt fixate și colorate prin tehnicile recomandate pentru cercetarea germenilor din genul *Treponema* (vezi ordinul *Spirochaetales*).

2. *Şancrul simplu.* Se şterge suprafaţa ulceraţiei prin tamponare cu ser fiziologic sau apă distilată. Apoi, cu o pipetă Pasteur efilată sau cu o ansă de platină, se recoltează o picătură de serozitate cu care se întind frotiuri. După uscare şi fixare, frotiurile sînt colorate prin metodele obişnuite.

Recoltarea exsudatelor pleurale. Se aseptizează cu grijă, prin badijonare cu alcool şi tinctură de iod, regiunea respectivă. Cu ajutorul unei seringi sterilizate în prealabil şi montate la un ac lung de 5—7 cm, cu lumen larg, se pătrunde la nivelul unui spaţiu intercostal în cavitatea pleurală şi se aspiră lichidul existent. Acest lichid este apoi introdus, în mod steril, într-o eprubetă sterilă, după care se examinează.

Recoltarea lichidului de ascită se efectuează prin puncţia cu ajutorul unui trocar montat la un aparat potrivit, sterilizat în prealabil şi numai după aseptizarea largă a tegumentelor abdomenului.

Recoltarea materialului patologic de necropsie în vederea examenelor bacteriologice se face cît mai curînd după moarte şi în condiţii riguroase de asepsie.

La alegerea produselor de examinat se va ţine seama totdeauna de diagnosticul clinic.

În genere, la necropsie, se recoltează sînge din inimă, probe de urină, bilă, conţinut stomacal, intestinal şi fragmente de organe.

Înainte de deschiderea cadavrului se procedează la aseptizarea prin badijonare cu alcool şi tinctură de iod a tegumentelor din regiunile anterioare şi laterale ale trunchiului. Se folosesc instrumente sterilizate în prealabil (pentru fiecare organ instrumente separate), iar operatorul va lucra numai cu mănuşi sterilizate. Instrumentele cu care se incizează tegumentele nu sînt folosite şi la alte manopere.

Deschiderea cadavrului trebuie făcută într-o anumită ordine, cavitatea abdominală fiind deschisă ultima.

Pentru recoltarea sîngelui din inimă se aplică mai întîi, pe suprafaţa inimii, o spatulă înroşită la flacără. Se extrage, prin puncţionare cu o seringă sterilă sau cu o pipetă cu bulă, o cantitate de sînge care este însămînţat pe diverse medii de cultură la adăpostul unei flăcări.

Recoltarea diferitelor exsudate (pleural, pericardic etc.) se face tot cu pipeta Pasteur. Se ridică, în fine, fragmente de plămîn, ficat, splină, rinichi, ganglioni mezenterici etc., care se depun separat în cutii Petri sterile.

Recoltarea bilei, urinii, ca şi a conţinutului stomacal se face prin puncţionarea cavităţilor respective, cu ajutorul unor pipete Pasteur, produsele recoltate fiind depuse în eprubete sterile sau însămînţate în lichide de conservare sau direct în medii de cultură.

Intestinul se deschide cel din urmă. Înainte de deschidere se leagă o ansă intestinală, de aproximativ 10 cm lungime, la două extremităţi.

Se efectuează la fiecare capăt cîte 2 ligaturi. Secţionarea ansei se face între aceste ligaturi. Fragmentul de intestin este depus într-un borcan steril.

Recipientele (eprubete, borcane, cutii Petri etc.), bine închise, ambalate şi corect etichetate, trebuie transportate la laborator în timp cît mai scurt şi în condiţii de refrigerare adecvată.

Recoltarea apei. Metodele de recoltare diferă, după cum este vorba de apă de robinet, apă de suprafaţă sau apă de profunzime.

1. Apa de robinet se recoltează în sticle cu dop şlefuit, montate cu dop de vată îmbrăcat în tifon şi purtînd capuşon de hîrtie, în prealabil sterilizate la autoclav (30 de minute la 120°).

Dopul de sticlă, împachetat în hîrtie, este legat de gîtul sticlei şi sterilizat o dată cu aceasta, fiind folosit după recoltarea apei pentru astuparea flaconului.

Înainte de recoltare se flambează gura robinetului şi se lasă să curgă apa 15—20 de minute. Se deschide flaconul, i se flambează gura, se umple 3/4 cu apă de examinat, se flambează din nou şi se astupă cu dopul de sticlă.

2. Apa din profunzime din puţuri, rezervoare etc. se recoltează în aparate speciale. Acestea sînt confecţionate, fie din flacoane de sticlă, montate la un suport de metal, care prezintă o greutate la fund, fie dintr-un sistem de închidere automat şi legate cu o sfoară de lungime variabilă.

Întregul dispozitiv este sterilizat în prealabil. În momentul întrebuinţării se deschide flaconul, care este apoi cufundat în apă. După umplerea lui (trei sferturi din capacitate) este scos la suprafaţă cu ajutorul sforii.

În cazul flacoanelor simple se flambează gura flaconului şi se astupă cu dopul de sticlă.

Probele trebuie corect etichetate cu data, ora şi locul recoltării. Transportul lor la laborator trebuie făcut cît mai repede posibil şi în condiţii de refrigerare.

Recoltarea probelor de alimente se efectuează în condiţii de sterilitate, folosind instrumente şi recipiente sterile.

Pentru recoltarea alimentelor în stare lichidă, se omogenizează conţinutul acestora prin agitare (sau amestecare cu ajutorul unei linguri), după care sînt depuse în flacoane sterile ermetic închise.

Pentru recoltarea alimentelor solide, se taie, cu ajutorul instrumentelor sterile, mici fragmente din diferite părţi ale probei de examinat, evitîndu-se pe cît posibil suprafaţa acesteia. Fragmentele se depun în plăci Petri sau borcănaşe sterile.

Probele, corect etichetate, sînt transportate la laborator în condiţii de refrigerare potrivită.

PARTEA a II-a

Procesul infecţios, imunitatea şi alergia

Procesul infecţios

Prof. N. Nestorescu, dr. Marcella Popovici

Nu există pînă astăzi o definiţie unanim admisă asupra infecţiei. Burnet defineşte infecţia drept un atac al unei fiinţe vii împotriva alteia, pătrunderea celei dintîi în organismul atacat şi dezvoltarea sa ca parazit pe socoteala celui din urmă.

După Zilber, infecţia poate fi definită ca „totalitatea proceselor biologice care se desfăşoară în organism în cazul pătrunderii în el a agenţilor patogeni”.

Oricare ar fi definiţia dată şi de alţi autori (Topley, Zlatogorov etc.), procesul infecţios reprezintă, în esenţă, un conflict care are loc între germenul microbian atacant şi organismul atacat, acest conflict nefiind decît aspectul particular al unei legi generale, existente în raporturile diferitelor specii.

Pentru ca procesul infecţios să apară şi să se dezvolte este însă necesar ca cei 2 participanţi ai conflictului să posede anumite proprietăţi.

Privit astfel, caracterul esenţial al procesului infecţios este determinat, pe de o parte, de caracterele de patogenitate ale germenului microbian şi de căile sale de pătrundere în organism, iar pe de alta, de reactivitatea imunologică a organismului invadat.

Caracteristica esenţială a procesului infecţios este specificitatea. Aceeaşi boală este produsă totdeauna de acelaşi agent cauzal, deşi ca formă clinică boala se poate prezenta sub aspecte variate. Importanţa specificităţii în procesul infecţios a fost „postulată” de către Koch în modul următor :

1. agentul patogen trebuie să fie găsit în toate cazurile de boală şi distribuţia lui în organism trebuie să fie în concordanţă cu leziunile observate ;

2. agentul patogen trebuie să poată fi izolat în cultură pură în afara organismului-gazdă ;

3. agentul patogen astfel obţinut trebuie să reproducă boala la animale sensibile.

Fără îndoială că exigenţele postulatelor lui Koch, cu toate progresele realizate în tehnica microbiologică şi imunologică, nu pot fi integral satisfăcute. Astfel, nu în toate cazurile de îmbolnăvire se poate găsi și izola agentul patogen și nu totdeauna se poate reproduce boala la animale de laborator, a căror receptivitate diferă deseori de aceea a omului. Astăzi, în epoca antibioticelor, care de cele mai multe ori duc rapid la distrugerea agentului cauzal, aceste postulate sînt și mai greu de atins.

Caracterele de patogenitate ale bacteriilor

Patogenitatea unui germen microbian este capacitatea acestuia de a învinge apărarea organismului și de a determina un proces infecțios specific, manifestat clinic. Cu toate că unii cercetători leagă patogenitatea exclusiv de parazitism, majoritatea autorilor o consideră însă ca un caracter de specie fără legătură necesară cu gradul de parazitism (Zilber).

Astfel, este cunoscut cazul unor specii microbiene care prin ele însele nu sînt patogene, dar au capacitatea de a elabora produse toxice capabile să producă îmbolnăviri (de exemplu, *Cl. tetani*, *Cl. botulinum* etc.).

Privită în acest fel, patogenitatea germenilor microbieni poate îmbina aspecte diferite, condiționate de :

— abilitatea agentului patogen de a invada organismul gazdei și de a-l folosi ca mediu de viață, unii avînd capacitatea de a difuza în organism și a produce infecții generalizate, alții rămînînd cantonați, fie la poarta de intrare, fie în alt țesut sau organ, determinînd infecții localizate ;

— eliberarea de produse toxice, capabile să lezeze țesuturile gazdei ;

— interferențe cu reacțiile metabolice normale ale organismului atacat ;

— producere de anumiți fermenți care catalizează, din precursori inactivi, anumite enzime cu acțiune dăunătoare, ca : hemolizine, leucocidine, enzime proteolitice etc. ;

— producerea, sub influența antigenelor microbiene, de substanțe toxice de metabolism din înseși țesuturile gazdei ;

— leziuni mecanice la nivelul țesuturilor.

Noțiunea de patogenitate exprimă, pe de altă parte, un raport foarte elastic între agentul patogen și gazda sa. Într-o gazdă foarte rezistentă, germenul microbian va avea o activitate patogenă restrînsă, pe cînd în una receptivă același germen se va arăta foarte patogen.

Caracterele esențiale de patogenitate ale bacteriilor sînt virulența și toxigeneza.

Între aceste caractere nu există însă raporturi directe.

Unii agenți microbieni își datorează patogenitatea lor exclusiv virulenței (de exemplu pneumococul), alții exclusiv capacității toxigene (*Cl. botulinum*), în timp ce alții au și atribute legate de virulență și caractere de toxinogeneză (de exemplu stafilococul).

Virulența

Virulența este proprietatea unui agent microbian de a pătrunde în organism, de a-l invada, de a se adapta și multiplica în țesuturile-gazdă, producînd leziuni și tulburînd funcțiile acesteia.

Pentru a pătrunde în organism, bacteria trebuie să învingă numeroasele mecanisme de apărare ale acestuia.

După primul contact cu gazda, probabil un mare număr de bacterii, înainte de a produce o leziune manifestă, este distrus. Cele care au supraviețuit, în cazul cînd au putere mare de invazie, de la poarta de intrare difuzează repede prin căile limfatice la ganglionii limfatici regionali și apoi în sînge, producînd infecții generalizate, cu sau fără localizări în organe și țesuturi. În alte cazuri, germenii rămîn localizați, fie la poarta de intrare, fie în țesuturile învecinate, producînd infecții de întindere limitată.

Multiplicarea celulelor bacteriene în țesuturi constituie una din condițiile esențiale ale dezvoltării ulterioare a infecției.

Printre numeroșii factori care condiționează virulența trebuie menționați în mod deosebit :

1. Capacitatea de *adaptare* a bacteriei la condițiile de viață pe care le găsește în organismul invadat. Această adaptabilitate este, la rîndul ei, legată de potențialul de variabilitate al bacteriei respective. Din acest punct de vedere există germeni virulenți numai pentru om, ca *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *S. typhi* etc., în timp ce alții sînt virulenți numai pentru anumite specii animale. În fine, o serie de bacterii prevăzute cu largi posibilități de adaptare afectează și gazde umane și gazde animale, de pildă anumite specii de *Salmonella* cauzatoare de toxiinfecții alimentare sau germenii din genurile *Brucella*, *Leptospira*, *Listeria* etc., agenți cauzali ai antropozoonozelor (boli comune omului și animalelor).

2. Tot în raport cu posibilitățile de adaptare ale germenilor microbieni se observă diferențe de virulență, după poarta de intrare în organism. Astfel, *N. gonorrhoeae* este virulent numai cînd este introdus pe cale genitală sau oculară, iar *Cl. tetani*, cînd pătrunde pe cale cutanată, în timp ce pe cale intestinală acești germeni sînt lipsiți de virulență.

3. Prezența *capsulei* a dovedit o relație strînsă cu un grad ridicat de virulență. Pierderea capsulei prin cultivare îndelungată sau în cursul procesului de disociație microbiană este însoțită de scăderea virulenței, și invers, trecerea prin animale sensibile a tulpinilor care au devenit avirulente și necapsulate exaltează virulența și, totodată, formarea capsulei (Zilber). Influența prezenței capsulei asupra caracterului de virulență poate fi explicată prin mai multe mecanisme. În primul rînd, numeroase cercetări au dovedit încă de multă vreme că învelișul capsular conferă bacteriei o rezistență crescută față de diferiții factori de apărare ai organismului, factori umorali naturali sau dobîndiți și fagocite (Danysz, Ward și Wright; Gruber și Futaki etc.). În al doilea rînd, capsula protejează germenul față de acțiunea agenților chimici. De capsulă sînt apoi legate o serie întreagă de antigene de înveliș de constituție polizaharidică, cu rol dovedit în imprimarea virulenței germenului, de exemplu antigenele capsulare ale pneumococului (Heidelberger și Avery).

4. Fenomenul de *disociație microbiană* ocupă, de asemenea, un loc important printre factorii care condiționează virulența. Încă de la lucrările lui Baerthlein și Arkwright s-a dovedit virulența particulară a formelor „S” pentru majoritatea speciilor microbiene patogene. Printre cele care fac excepție, fiind mai virulente în forma „R“, trebuie reamintit mai ales *B. anthracis*, *M. tuberculosis* și *C. diphtheriae*.

Modificările de virulență care survin în cursul fenomenului de disociație sînt, probabil, legate în mare parte de modificările proprietăților antigenice. Într-adevăr, pentru majoritatea speciilor microbiene patogene, formele „S" sînt acelea care prezintă o integritate antigenică, în timp ce formele „R" posedă antigene degradate; de pildă, în familia *Enterobactericeae*, antigenele somatice „O" ale formelor „R" sînt profund modificate în structura lor chimică, în componența complexului glucido-lipidic. În esență însă toate aceste modificări sînt modificări genetice.

5. Legătura dintre *structura antigenică* a bacteriilor şi *virulență* a fost stabilită de numeroase cercetări. Prezența unor anumite antigene la tulpinile virulente a fost descrisă la o serie întreagă de microorganisme, printre care *S. typhi*, pneumococ, streptococ hemolitic, *B. anthracis*, *Haemophilus influenzae* etc.

În special antigenele de înveliș, par să ocupe un rol important în determinarea virulenței. După cum se știe, aceste antigene sînt de natură polizaharidică (pneumococ, streptococ hemolitic), fie în exclusivitate, fie complexe de glucide cu lipide și proteine (*Enterobacteriaceae*).

Raporturile dintre virulență și structura antigenică cunosc diferite mecanisme:

a) interferență cu factori de imunitate naturală, ca: neutralizarea activității bactericide a unor umori, fapt demonstrat pentru substanța capsulară polipeptidică a *B. anthracis*, capabilă să neutralizeze o substanță antracidală prezentă în țesuturile animalelor normale (Blorm și colaboratorii, 1947);

b) producerea unui grad de leucopenie, de exemplu antigenul somatic al *S. typhi*;

c) interferență în procesul de fagocitoză, prin acțiunea de inhibare de către polizaharidul capsular al fagocitelor.

Dacă structura antigenică condiționează în mare măsură virulența germenilor patogeni, se cunosc și cazuri cînd tulpini cu structură antigenică identică și avînd forme de cultură similare arată grade diferite de virulență. Exemple numeroase în acest sens oferă germenii din grupurile *Salmonella*, *Escherichia* etc.

Aceasta denotă că virulența este condiționată de mai mulți factori care-și însumează efectele și nu depinde de un singur caracter.

6. *Vîrsta culturii* pare de asemenea să influențeze virulența; în genere culturile tinere, proaspăt izolate din organism, sînt mai virulente.

7. Elaborarea a diverse *enzime cu acțiune specifică* contribuie, de asemenea, în mod neîndoios, la determinarea virulenței. Printre acestea sînt de menționat: hemolizinele, leucocidinele cu efect distrugător asupra leucocitelor, coagulaza, fibrinolizina, factorii de răspîndire, hialuronidaza etc.

Coagulaza intervine în mecanismul de coagulare a sîngelui, producînd, împreună cu un component plasmatic, o substanță precursoare trombinei, care stimulează transformarea fibrinogenului în fibrină. Peste 97% din stafilococii patogeni s-au dovedit capabili să coaguleze plasma aparținînd unor specii animale (om, iepure, cal). Plasma de cobai, șobolan, șoarece, pasăre nu este coagulată. Mecanismul prin care producerea de coagulază influențează virulența pare a fi legat de inhibarea fagocitozei prin intermediul barierei de fibrină pe care o produce.

Fibrinolizina, substanță capabilă să topească cheagul de fibrină, ar influența virulența, favorizînd difuzarea infecției în țesuturile învecinate.

Mecanismul de acţiune nu este bine stabilit. Se pare că acţiunea fibrinolitică s-ar datori de fapt unei kinaze, capabilă să activeze un factor prelitic din sîngele normal. Streptococii β-hemolitici şi stafilococii patogeni se arată în mod deosebit producători de fibrinolizină.

Factorii de difuziune — hialuronidaza. Factorul de difuziune, descris prima oară în 1928 de către Duran-Reynals, a fost demonstrat la numeroase specii microbiene, printre care: clostridii, streptococi, stafilococi etc. Natura factorului de difuziune, insuficient cunoscută, pare a fi legată de hialuronidază. Această enzimă, capabilă să producă hidroliza acidului hialuronic, care constituie unul din principalii componenţi ai substanţei fundamentale a ţesutului conjunctiv, produce permeabilizarea acestuia. Prin acest mecanism, hialuronidaza favorizează invazivitatea agentului patogen, caracter care constituie un binecunoscut atribut de virulenţă.

Proteinazele, amidazele, lecitinazele, colagenazele, elaborate mai ales de germenii din genul *Clostridium,* influenţează virulenţa, prin devitalizarea sistemelor celulare şi a ţesuturilor.

8. Un rol favorizant asupra virulenţei îl au *proteinele microbiene* cu caracter pirogen (*M. tuberculosis, Treponema pallidum, Brucella* etc.).

9. *Agresinele* şi *virulinele,* produse microbiene cu puternică acţiune chimiotactică negativă, realizează îndepărtarea fagocitelor de la nivelul ţesuturilor infectate.

10. *Asociaţia microbiană* poate exercita efecte sinergice, ducînd la creşterea virulenţei agenţilor patogeni respectivi.

Condiţionată de factori atît de numeroşi, virulenţa bacteriilor constituie un caracter inconstant, supus la mari variaţii, fiind un atribut individual de tulpină şi nu de specie.

*

Criterii de apreciere a virulenţei. Gradul de virulenţă al unei tulpini se poate aprecia după numărul minim de germeni microbieni necesar să producă infecţia, cînd este administrat pe o anumită cale, la un animal sensibil, de o anumită greutate, aceasta constituind doza minimă activă (D.M.A.).

O altă unitate de măsurare a gradului de virulenţă este stabilirea dozei minime certe letale (D.M.C.L.) care constă în determinarea cantităţii minime de germeni capabili să producă moartea 100% a animalelor sensibile de o anumită greutate şi folosind o anumită cale de administrare. Actualmente, virulenţa bacteriilor se stabileşte în raport cu doza minimă de germeni, care produce o letalitate de 50% ($D.L.M._{50}$), care reprezintă un criteriu mai exact.

Durata perioadei de incubaţie, durata bolii, intensitatea fenomenelor morbide, gradul de extindere a acestora etc. servesc de asemenea pentru aprecierea virulenţei agenţilor infecţioşi.

Condiţii de modificare a virulenţei

Exacerbarea virulenţei poate fi obţinută pe diferite căi.

În genere, tulpinile microbiene arată un grad ridicat de virulenţă îndată după izolarea lor din organismul uman sau animal sensibil.

Încă de la cercetările lui Pasteur asupra turbării s-a pus în evidenţă creşterea virulenţei virusului turbării prin treceri repetate la iepuri inoculaţi pe cale intracerebrală. Pasteur a obţinut în acest fel „virusul fix", virus cu virulenţă crescută şi constantă. Ulterior, metoda exacerbării virulenţei prin treceri pe animale receptive a fost experimentată şi la numeroase alte specii microbiene, cu aceleaşi bune rezultate.

Anumite fapte de observaţie epidemiologică indicînd exacerbarea virulenţei germenilor în cursul valurilor epidemice cunosc acelaşi mecanism al trecerilor repetate prin organisme receptive.

Asocierea germenilor microbieni aparţinînd la specii microbiene diferite, sau a unei specii bacteriene cu un virus permite, în unele cazuri, un efect patogen crescut, de pildă asocierea *B. anthracis* cu *Cl. septicum* sau cu virusul turbării produce mortalitate la iepuri în primul caz, la cîini în al doilea caz, în doze mult mai mici decît inocularea lor separat.

Este, desigur, greu de precizat dacă în asemenea cazuri este vorba de creşterea virulenţei fiecărei specii în parte sau de sumarea efectelor lor patogene.

Cultivarea bacteriilor în saci de colodiu în cavitatea peritoneală a unui animal este însoţită, de asemenea, de creşterea virulenţei. Metoda a fost utilizată pentru prima oară de către Mecinikov, care a obţinut cu ajutorul ei creşterea virulenţei vibrionilor holerici.

Tot în mod experimental, Griffith a obţinut modificarea dirijată a virulenţei, legată de transformarea unui tip de pneumococ în altul.

Asupra mecanismului creşterii virulenţei în anumite condiţii s-au dat diferite explicaţii. Astfel, J. Bordet acordă un rol principal unui mecanism de adaptare, în timp ce Ch. Nicolle pune la baza acestor modificări un proces de selecţie a indivizilor mai virulenţi.

Atenuarea virulenţei bacteriilor poate fi, la rîndul ei, obţinută în diferite condiţii.

Subcultivarea repetată a germenilor microbieni pe medii artificiale, cît şi păstrarea lor îndelungată în condiţii de laborator, scad virulenţa culturilor, în unele cazuri treptat, în altele foarte repede.

Cultivarea bacteriilor pe medii nepotrivite, ca şi trecerea lor pe medii proaspete, la intervale mari de timp, au acelaşi efect. În acest caz, epuizarea substratului nutritiv, acumularea în mediu a produselor toxice de metabolism şi schimbarea reacţiei chimice a mediului par a sta la baza modificărilor de virulenţă. Adăugarea la mediile de cultură a unor substanţe de ordin chimic sau biologic, nefavorabile dezvoltării germenilor, contribuie de asemenea la scăderea virulenţei bacteriilor. Exemplul clasic privind acest mijloc de atenuare a virulenţei este constituit de obţinerea de către Calmette şi Guérin a variantei avirulente de *M. tuberculosis* de tip bovin, cu care se prepară vaccinul B.C.G., prin cultivarea germenilor timp de 13 ani pe cartof glicerinat, biliat.

Adăugarea de ser imun specific la mediile de cultură permite obţinerea de culturi cu virulenţă atenuată.

Tot în scopul de a favoriza dezvoltarea unor bacterii cu virulenţă atenuată se poate folosi şi acţiunea agenţilor fizici. Prin cultivare prelungită la o temperatură mai ridicată decît cea optimă de dezvoltare se obţin culturi atenuate. Procedeul a fost iniţial folosit de Pasteur, la prepararea vaccinului anticărbunos.

În sfîrşit, trecerile repetate prin organisme slab receptive exercită o acțiune netă asupra procesului de atenuare a virulenței culturilor respective.

Diferitele metode descrise îşi găsesc o largă aplicare, mai ales în tehnicile de preparare a vaccinurilor.

Toxigeneza

Al doilea caracter esențial de patogenitate a germenilor microbieni este constituit din capacitatea de a elabora substanțe toxice cu anumite proprietăți fizice, chimice şi biologice, care au luat numele de toxine bacteriene.

Se deosebesc două feluri de toxine: unele care se separă uşor de bacteriile care le produc, difuzînd în mediu, denumite toxine adevărate sau *exotoxine*, şi altele care sînt strîns legate de celula bacteriană, greu sau de loc difuzibile în mediu şi care au fost denumite *endotoxine*.

1. **Exotoxinele.** Printre caracteristicile exotoxinelor se pot enumera:

1. Activitatea sau puterea toxică. Această activitate variază de la o specie microbiană capabilă de toxigeneză la alta şi chiar de la o tulpină ale aceleiaşi specii la alta. Astfel, B. *anthracis* este slab sau de loc toxigen, pe cînd *Cl. botulinum* este capabil să elaboreze o exotoxină de o activitate considerabilă (toxina purificată de *Cl. botulinum* A conține, în medie, 1 200 000 de doze limită mortale pe miligram pentru 1 kg/cobai). Între aceste două extreme se întîlnesc specii microbiene patogene capabile să elaboreze exotoxine de activitate variată, cum sînt *C. dyphtheriae*, *Sh. dysenteriae*, *Cl. tetani*, *Cl. oedematiens*, *Cl. perfringens* etc.

Activitatea unei exotoxine se măsoară prin puterea ei de a ucide animalele sensibile cînd este administrată pe căi convenabile. În condiții obişnuite şi pe mediile curent folosite pentru diferitele specii microbiene indicate mai sus, filtratele de cultură omoară animalele sensibile, în general, în diluții de 1 :1 500 pentru *C. dyphtheriae*, 1 :5 000—1 :10 000 pentru *Sh. dysenteriae*, 1 :3 000 000 pentru *Cl. tetani*, 1 :10 000 pentru *Cl. oedematiens* etc.

Se numeşte D. L. M. (doză limită mortală) cantitatea de toxină elaborată de o anumită specie microbiană care ucide cu leziuni specifice un animal sensibil, de o anumită greutate, într-un anumit interval de timp. Spre pildă, D. L. M. a unei toxine de *C. dyphtheriae* este cantitatea de toxină care omoară cobaiul de 250 g cu leziuni specifice, într-un interval de 4 zile. Se numeşte D. L.$_{50}$ cantitatea de toxină care omoară 50% din numărul animalelor inoculate, în condițiile arătate pentru stabilirea D. L. M.

2. Exotoxinele posedă componente toxice multiple; pe de altă parte, fiecare componentă poate să se manifeste sub mai multe aspecte. Spre exemplu, exotoxina elaborată de *Cl. perfringens* conține 11 componente toxice (α, β, γ, δ, ε, θ, η etc.), bine individualizate prin manifestările lor letale, hemolitice, necrotice etc., care pot varia de la o componentă la alta şi care pot fi neutralizate specific, cu ajutorul serurilor monoreceptoare. Înseşi aspectele toxice ale componentelor sînt multiple; aşa, bunăoară hemolizinele stafilococului patogen sînt numeroase: hemolizina α β, γ, δ şi ε, fiecare din aceste hemolizine avînd anumite caractere distincte în ceea ce priveşte activitatea lor asupra hematiilor de diverse specii animale, temperaturi diferite de inactivare, comportare diferită la agenţi chimici etc. Componenta α a *Cl. perfringens* are acţiune letală, hemolitică, necrotică şi lecitinazică, în opoziţie cu componenta θ spre pildă, care are acţiune hemolitică, dar nu licitinazică şi letală.

Toxina *Cl. tetani* este spasmogenă şi hemolitică; efectul nociv al toxinei este legat mai ales de manifestarea sa nervoasă, spasmogenă, acţiunea hemolitică fiind destul de slabă.

În raport cu afinitatea lor pentru anumite organe şi ţesuturi se mai pot da ca exemplu toxina *Sh. dysenteriae*, cu afinitate neurotropă şi enterotropă, sau toxina stafilococică cu efecte necrotice, letale, leucocidinice, în afară de cele hemolitice semnalate mai sus.

Problema unicităţii sau pluralităţii componentelor toxice ale unei toxine nu este încă rezolvată. Unii autori, spre exemplu Burnet, sînt de părere că de fapt nu există decît o singură toxină cu mai multe proprietăţi, pe cînd alţi autori, spre exemplu Gunther, Weld, sînt de părere că toxinele sînt un amestec de componente toxice, cu acţiuni selective pentru un anumit ţesut. Nu se cunoaşte mecanismul acestei acţiuni selective; este probabil ca la baza ei să existe o asemănare fizică sau chimică între celulele lezate şi componenta toxică. Se pare că lipoizii au un rol în activitatea selectivă a componentelor toxice asupra ţesutului nervos.

Calea de răspîndire a exotoxinelor este variată: limfatică, sanguină sau nervoasă; ele pot avea o acţiune locală sau cu efecte la distanţă: de exemplu, exotoxina difterică, care produce leziuni la nivelul mucoasei amigdaliene şi faringiene şi leziuni la distanţă, îndeosebi în miocard şi capsulele suprarenale.

Toxinele microbiene elaborate în organismele sensibile sînt în parte fixate pe celule, în parte distruse sub acţiunea enzimelor şi în parte eliminate prin emonctorii. Absorbţia exotoxinelor se face pe celule în mod selectiv, potrivit afinităţii pentru anumite ţesuturi, nu numai la nivelul parenchimului organelor, dar şi pe eritrocite.

Fixarea de celulele organismului intoxicat nu se efectuează pentru toate toxinele în acelaşi interval de timp. Unele din ele, cum sînt toxina *Cl. perfringens*, toxina stafilococică etc., se fixează cu maximum de rapiditate (cîteva secunde sau cîteva minute); altele, cum sînt toxinele difterică, tetanică sau botulinică se fixează numai după un interval de timp (8—20 de ore), chiar dacă s-ar administra deodată mai multe mii de doze mortale de toxină.

Prima categorie de toxine a luat denumirea de toxine fără incubaţie, în opoziţie cu cea de a doua categorie, cărora le trebuie un timp prelungit pînă să determine semne evidente de intoxicaţie specifică, fapt pentru care au primit denumirea de toxine cu perioadă de incubaţie.

În organismul animalelor nereceptive, toxinele nu se fixează, ele circulă în sînge pînă sînt eliminate, de obicei prin urină.

3. Natura chimică a exotoxinelor. Exotoxinele sînt produse biologice de natură coloidală, în general nedializabile, de constituţie chimică complexă. Toate exotoxinele, care au fost însă purificate, par să fie simple proteine, fără grupări prostetice, a căror greutate moleculară diferă după specia microbiană de germeni care le-a elaborat. Astfel, toxina eritrogenă a streptococului piogen are o greutate moleculară de 27 000, toxina *C. diph-*

theriae are o greutate moleculară de 72 000 (Pappenheimer); toxina de *Sh. dysenteriae* 82 000 (van Heyningen); toxina de *Cl. botulinum* 900 000 (Putnam). Unele din aceste exotoxine au fost cristalizate (*Cl. tetani*, *Cl. botulinum* A etc.). Aceste toxine cristalizate s-au arătat omogene electroforetic. Componenţa lor în aminoacizi este astăzi stabilită şi ca număr, şi ca reprezentare cantitativă.

4. Termorezistenţa exotoxinelor diferă de la exotoxina unei specii microbiene la exotoxina unei alte specii. Ţinînd seamă de natura lor chimică, exotoxinele se inactivează de obicei la 60° (toxina difterică la 60°, în 1–2 ore; toxina tetanică la aceeaşi temperatură, în 20 de minute). Sînt unele exotoxine care se comportă cu totul particular faţă de temperatură. Astfel, toxinele *Cl. botulinum* rezistă un timp apreciabil toxinele *Cl. perfringens* (toxina α) îşi menţin 75% din activitatea lor şi după o încălzire de 5 minute la 100°. Mai mult încă, această toxină, încălzită la temperaturi de 60–70°, pînă devine inactivă, îşi recuperează din activitatea ei toxică iniţială dacă este reîncălzită la temperatura fierberii (Guillaumie). La fel se petrece şi cu toxina stafilococică; această toxină este inactivată într-o mare proporţie la 65°; ea îşi recapătă din activitatea pierdută dacă este încălzită la 100° (Fulton).

5. Antigenitatea exotoxinelor. Dacă se inoculează în mod repetat, la animale, doze subletale de toxină, se obţin în serul animalelor astfel tratate anticorpi specifici, neutralizanţi de toxină.

În general cantitatea de antitoxină necesară pentru neutralizarea exotoxinei este, pînă la un punct, direct proporţională cu cantitatea toxinei introduse. Dacă ţinem seamă de titrurile serurilor antitoxice obţinute, exotoxinele se dovedesc antigene foarte puternice, cu toate că se constată variaţii în cantitatea de anticorpi neutralizanţi în raport cu specia de animal inoculată şi exotoxina folosită.

6. Acţiunea farmacodinamică a exotoxinelor este uşor de scos în evidenţă datorită strictei lor specificităţi. Spre pildă, efectele intoxicaţiei difterice, tetanice sau botulinice sînt diferite. Pe cînd intoxicaţia difterică se manifestă prin simptome legate de suferinţa miocardului şi capsulei suprarenale, simptomatologia tetanosului este legată de suferinţa sistemului nervos, iar a intoxicaţiei botulinice de suferinţa sistemului neurovegetativ şi a nervilor cranieni.

7. Mecanismul de acţiune a exotoxinelor: exotoxinele intervin în procesele metabolice esenţiale ale ţesuturilor animalelor intoxicate. Această intervenţie poate fi legată, fie de otrăvirea enzimelor, fie de împiedicarea sintezei lor (Pappenheimer), fie de alterarea substanţelor care devin insensibile faţă de enzime, fie modificînd calitativ şi cantitativ produsele de desfacere a enzimelor, fie, în fine, tulburînd relaţiile fizico-chimice ale metaboliţilor etc. Alteori toxinele acţionează desfăcînd complexele lecitinoproteice ale membranelor celulare de care sînt legate fenomenele de osmoză selectivă a celulelor (toxina α a *Cl. perfringens*, streptolizinele etc.).

Exotoxinele, fiind active în concentraţii foarte mici, sînt asemănătoare enzimelor; unele din ele sînt enzime (lecitinaza *Cl. perfringens*), altele nu par să fie, mecanismul lor de acţiune fiind legat de procesele arătate mai sus.

8. Transformarea în toxoizi a exotoxinelor: încă cu multe decenii în urmă, Ehrlich a arătat că toxinele îşi pot pierde toxicitatea, fără să-şi piardă și puterea lor de a stimula anticorpi. Ulterior s-a arătat că această modificare se poate obține mai ușor cu ajutorul unor substanțe chimice, ca iodul, compușii diazo, disulfura de carbon etc., și mai ales prin formol, care în producția de anatoxină este cel mai utilizat. Nu se cunoaște încă mecanismul detoxificării, cu toate că au fost emise numeroase ipoteze. Se pare că opinia lui Pillemer (1948), care susține că transformarea unei exotoxine în toxoid constă în esență într-o condensare a moleculelor de toxină, catalizată de substanțele arătate mai sus, este azi cea mai adoptată.

9. Prepararea, purificarea și cristalizarea exotoxinelor : în general, fazele folosite pentru prepararea, purificarea și eventual cristalizarea exotoxinelor sînt următoarele : mediul de cultură folosit este astfel preparat, încît, în vederea obținerii unei toxine cît mai active, să conțină substanțele plastice, și de calitatea și variația cerută de biologia germenului. De aceea, fiecare specie toxigenă de germen își elaborează exotoxina pe un mediu preferențial. Prepararea de toxină pe medii sintetice este uneori ideală, însă obținerea cantităților industriale de toxină nu este rentabilă ; pe de altă parte, exotoxinele fiind nedializabile, este greu de obținut totdeauna toxine active pe medii care nu conțin constituente nedializabile.

Tulpinile de germeni folosite pentru însămînțarea mediilor de cultură sînt alese dintre acelea care și-au făcut proba capacității lor toxigene în mai multe laboratoare. Astfel, tulpina de referință pentru obținerea exotoxinei stafilococice este tulpina de stafilococ Wood ; tulpina de referință pentru obținerea exotoxinei difterice este tulpina de *C. diphtheriae* „William Park 8" ; tulpina de referință pentru obținerea toxinei tetanice este tulpina de *Cl. tetani*, varianta mobilă 21 D, serotipul III etc.

Durata, ca și temperatura de incubare a mediului de cultură însămînțat sînt în funcție de specia microbiană și particularitățile tulpinii. Ea poate fi de 8—14 ore (*Cl. perfringens*) sau mai multe zile (*C. diphtheriae*, *Cl. tetani*, *Cl. botulinum* etc.), temperatura fiind de 33—34° (*Cl. perfringens*) și de 37—38° (*C. diphtheriae*).

Cînd se apreciază că o cultură de germeni microbieni are o activitate toxică maximă, dovedită prin stabilirea D.L.M., cultura se filtrează. Dacă operația filtrării duce la o pierdere considerabilă de toxină sau la degradarea ei, toxina se poate centrifuga puternic, pînă la limpezirea ei completă. Apoi se stabilește puterea ei antigenică, fie *in vitro*, fie *in vivo*. În fine exotoxina astfel obținută se supune concentrării, purificării și eventual cristalizării după unul din procedeele cunoscute.

Eaton și Gronau, folosind sulfatul de amoniu și clorura de cadmiu, au obținut din toxina tetanică un preparat de 125 ori mai activ pe unitate de greutate uscată decît pe filtratul crud. Boivin a folosit acidul tricloracetic la rece pentru purificarea toxinei difterice. Cu acest procedeu, produsul obținut nu conține nici polizaharizi și nici lipoizi, cantitatea de 0,003 mg din acest produs reprezentînd o unitate floculantă de toxină. Brygoo precipită toxina cu ajutorul acidului hexametafosforic. Se pare însă că cea mai bună metodă de purificare este cea recomandată de Snipe și Sommer, care au încercat purificarea toxinelor după procedeul folosit de Willstäter pentru separarea enzimelor. Procedeul acestor autori constă în precipitarea toxinelor prin acizi și eluarea cu ajutorul unui tampon cu pH apropiat. Spre pildă, Lamanna și colaboratorii au folosit, pentru purificarea toxinei botulinice, următoarea tehnică : toxina crudă este tratată cu acid clorhidric 2 N la pH 3,5 obținînd un precipitat. Precipitatul este apoi centrifugat la 1 800 t/minut, spălat cu apă distilată și centrifugat din nou. Precipitatul reluat în apă distilată este adiționat cu ClNa, și în urmă, adus la pH 6,5 cu acetat de sodiu. Se centrifughează din nou la 1 800 t/minut, pentru a elimina impuritățile solide. Supernatantul este tratat cu cloroform și agitat viguros în atmosferă de CO_2, pH devenind 5,8–6,1. Se elimină excesul de cloroform și lichidul toxic conține 15–30 de milioane D.L.M. șoarece pe ml. Se adaugă apoi sulfat de amoniu, pentru a obține 20% saturație. După refrigerare, toxina precipitată este centrifugată, în urmă luată cu acetat de sodiu în soluție 0,075 ml, la pH 6,5–6,7. Se coboară pH la 5 prin adăugare de HCl, se centrifughează și se reia prin ClNa + acetat de sodiu, repetînd această operație de mai multe ori. După eliminarea sărurilor se procedează la cristalizare. Examinate, cristalele nu conțin decît o singură substanță toxică.

10. Toxinele purificate sau cristalizate sînt studiate apoi din punct de vedere al caracteristicilor fizice, chimice și biologice. Pentru aceasta se determină : proprietățile organoleptice, rezistența la agenți fizici și chimici, diagrama de sedimentare (ultracentrifugă) și constanta de difuziune pentru determinarea greutății moleculare, omogenitatea electroforetică, cantitatea de azot și acizi aminați, eventuale grupări prostetice etc. Se stabilește apoi activitatea toxică prin inoculări la animale sensibile și capacitatea de a fi neutralizate de serul homolog.

2. **Endotoxinele** după Van Heyningen, sînt componente structurale ale celulelor bacteriene, fiind în același timp antigenul somatic dominant al tulpinilor forma „S"; aceste substanțe sînt întîlnite și în autolizatele lipsite de celule. Încă de multă vreme era dovedit că celulele bacteriene patogene sau chiar nepatogene, omorîte și spălate, provenind de la o serie de germeni microbieni gram-negativi, sînt toxice. Ulterior, endotoxinele au putut fi obținute, fie prin înghețare și dezghețare, fie prin vibrații sonice sau triturare prelungită în mojar de agată, fie prin extracție cu diferiți solvenți, fie, în fine, prin simplă autoliză.

1. Activitatea toxică a endotoxinelor este slabă. $D.L.M._{50}$ pentru șoarece a unei endotoxine este de ordinul miligramelor, ceea ce constituie o cantitate enormă, în comparație cu cantitatea minimă de exotoxină cerută pentru același efect.

2. Natura chimică a endotoxinelor. După constatările lui Boivin și Mesrobeanu (1933–1935), Raistrick și Topley (1934) etc., constituția chimică a endotoxinelor germenilor gram-negativi este un complex de fosfolipide și polizaharide. Aceste complexe glucido-lipidice se desfăceau prin hidroliză într-un polizaharid netoxic, care poate fi considerat ca o haptenă și o lipidă cu toxicitate redusă.

În 1940, Morgan și Partridge au pus în evidență în endotoxina *Sh. dysenteriae* o a treia componentă — un polipeptid — care părea să fie o proteină conjugată. Complexul are o activitate de 10 DL_{50} șoarece pe miligram de produs. În general, compoziția chimică a endotoxinelor este în funcție și de metoda de extragere.

În ultima vreme, un rol important într-un număr de procese biologice se atribuie lipidelor endotoxinei (antigenul somatic). Westphal și Luderetz (1954) au arătat că endotoxinele conțin două categorii de lipide : lipide puternic legate de substratul glucido-lipido-polipeptidic, denumit lipidul A și lipide ușor extractibile, denumit lipidul B. După cercetările lui Rowley, Delaunnay, Humphrey și alții, pirogenitatea, toxicitatea, stimularea de anticorpi, activitatea necrozantă a tumorilor, acțiunea antialergică etc. par să fie datorite lipidului AM constituent al endotoxinelor.

3. Termorezistența endotoxinelor este deosebit de marcată. Ele rezistă la 100°, la fel ca și antigenul somatic al germenilor cu care, după cum s-a văzut, se confundă.

4. Antigenicitatea endotoxinelor prezintă caractere particulare: pe cînd stimularea de aglutinine, precipitine și uneori chiar de anticorpi protectori este destul de marcată, puterea neutralizantă antiendotoxică este minimă sau absentă. Uneori se pot obține și seruri cu acțiune neutralizantă, însă nu se constată niciodată un raport cantitativ între endotoxina în reacție și cantitatea de ser antiendotoxic. Din această cauză, la o anumită cantitate de endotoxină, oricîtă cantitate de ser antiendotoxic s-ar adăuga, efectul letal tot apare.

Dintre componentele endotoxinei numai proteina este antigenică; ea se poate cupla cu polizaharidul specific, luînd caracter de antigen specific complet. Nu se cunoaște bine rolul imunologic al celorlalte fracțiuni.

5. Acțiunea farmacodinamică a endotoxinelor nu este specifică. Endotoxinele, oricare ar fi proveniența lor, au la mamifere efecte similare. La cîteva ore după inocularea endotoxinelor, animalele prezintă diaree și convulsii, uneori asociate cu paralizia trenului posterior. Simptomele sînt asemănătoare șocului hemodinamic cu insuficiență circulatorie periferică. La necropsie se constată congestia organelor, edem și hemoragii pe peretele intestinului, în viscerele abdominale și plămîni.

6. Mecanismul de acțiune a endotoxinelor este puțin cunoscut. Se știe numai că administrarea de endotoxină provoacă hiperglicemie, urmată de o hipoglicemie pronunțată, înaintea morții animalului. În eventualitatea că animalul inoculat se însănătoșește, glicemia revine la normal. S-a constatat și o tulburare a metabolismului piruvic. Leucopenia însoțește mai totdeauna intoxicația cu endotoxină (în special la *S. typhi*).

7. Transformarea endotoxinei în toxoizi cu ajutorul formolului nu este posibilă.

8. Prepararea endotoxinelor se face folosind procedee multiple. Printre primele procedee folosite au fost cel al lui Boivin și Mesrobeanu (1933), care au deproteinizat corpii microbieni cu ajutorul acidului tricloracetic și au purificat extractele prin dializă și precipitări ulterioare, alcoolice sau acetonice. Cam în aceeași vreme, Raistrick și Topley (1934) au folosit digestia triptică, însoțită de precipitări fracționate cu alcool. Morgan folosește dietilenglicolul, reușind să separe diversele fracțiuni chimice prezente în extractul total. Mai tîrziu, Webster, Landy au extras endotoxine cu ajutorul acidului acetic diluat cu precipitări fracționate cu alcool în mediu salin. În fine, Gostec și Rîkaleva au studiat valoarea diverselor metode în raport cu puterea imunogenă a extractelor.

Reactivitatea macroorganismului față de germenii patogeni

Așa cum s-a arătat, pentru realizarea procesului infecțios, pe lîngă anumite caractere de agresivitate de partea agentului microbian, este necesar ca organismul atacat să prezinte un anumit grad de receptivitate.

O serie de caractere biologice proprii speciei, cuprinzînd constituția anatomică și fiziologică a organismului, realizează un potențial de apărare a acestuia față de infecție. Multiplele fenomene de interdependență care se petrec în organismul uman sau animal, realizînd un echilibru în funcționarea diferitelor organe și țesuturi, contribuie la crearea stării de rezistență la infecție. În mecanismul rezistenței față de agenții patogeni intervin o serie întreagă de factori, care, pe de o parte, împiedică pătrunderea germenilor microbieni în organism, iar pe de alta, inhibează, distruge și elimină pe cei care au reușit să pătrundă.

Printre factorii care condiționează rezistența naturală trebuie menționați în primul rînd : barierele cutanate și mucoase, echilibrul florei normale cu acțiune antagonistă față de diferiți agenți patogeni, factorii umorali cu acțiune bactericidă acționînd prin procese de fagocitoză și inflamație.

La rîndul ei, această rezistență naturală a organismelor la infecție poate însă suferi modificări în funcție de diferiți factori. Astfel, variații mari de receptivitate se observă în raport cu vîrsta. De obicei, gradul de receptivitate este mai mare în copilărie, scăzînd la vîrsta adultă, pentru a crește din nou către bătrînețe.

Alimentația influențează în mod neîndoios receptivitatea față de infecție. Numeroase fapte de observație, ca și cercetări experimentale, au dovedit că stările de subnutriție, de înfometare, regimul deficitar în vitamine, aminoacizi, săruri minerale (calciu, sodiu, magneziu etc.) produc micșorarea rezistenței organismului la infecție.

Scăderea rezistenței la infecție sub influența oboselii a fost de asemenea dovedită experimental și clinic ; mecanismul scăderii rezistenței în aceste condiții s-ar datori unei inhibiții a fagocitozei (Zilber).

Deosebiri mari de receptivitate au fost studiate, pe de o parte, în raport cu specia animală, iar pe de alta, în raport cu tipurile în interiorul aceleiași specii. Bineînțeles că în interpretarea faptelor de observație trebuie ținut seama de condițiile diferite de viață, care ar putea contribui la crearea acestor diferențe.

Bolile de nutriție, de metabolism, bolile cașectizante, diferitele stări de dezechilibru hormonal, neurovegetativ, sanguin etc. scad, de asemenea, rezistența organismului la infecție.

Rolul mediului înconjurător

Mediul înconjurător poate influența procesul infecțios acționînd, fie asupra agentului patogen, fie asupra macroorganismului.

Temperatura s-a dovedit a exercita cele mai variate efecte. Un exemplu clasic de acțiune a hipotermizării îl constituie experiența lui Pasteur, care a reușit să scadă rezistența la infecția cărbunoasă a puilor de găină, scăzînd temperatura corpului prin cufundarea extremităților în apă rece. Alte experiențe au demonstrat, dimpotrivă, scăderea rezistenței la infecție prin hipertermizare, de exemplu, experiențele lui Zdrodovski asupra evoluției enteritelor la cobai și iepuri supuși supraîncălzirii. Mecanismul de acțiune a temperaturii și într-un caz și într-altul pare să constea în influența ei asupra reacției fagocitare, care ar necesita un grad optim de temperatură. Pe de altă parte, temperatura influențează, în același timp, și caracteristicile vitale și de metabolism ale agentului microbian. Condițiile meteorologice, de umiditate, influențează de asemenea apariția și evoluția procesului infecțios. Este binecunoscută incidența ridicată a unor boli infecțioase în raport cu anotimpul, de pildă infecțiile aparatului respirator în anotimpul rece, infecțiile intestinale în anotimpul cald.

Lumina solară exercită o acțiune favorabilă asupra organismului, mărindu-i rezistența la infecție.

Folosirea pe scară largă a antibioticelor a creat și selecționat numeroase variante de patogenitate ale germenilor microbieni, avînd repercusiuni din cele mai variate asupra mecanismului și evoluției procesului infecțios.

Este un fapt stabilit astăzi că iradiația generală a organismului cu raze Roentgen în doze de 200 — 1 000 r, mărește receptivitatea acestora față de diferite infecții.

Asociațiile microbiene, prin devierea elementelor de apărare ale organismului, favorizează activitatea germenului patogen principal, ca de pildă în infecțiile plăgilor; germenii din genul *Clostridium* sînt frecvent asociați cu alți germeni.

Uneori o infecție cronică, stimulînd proprietățile de apărare ale organismului, apără împotriva unei infecții acute; de exemplu, infecția cu B. C. G. apără împotriva infecțiilor acute tuberculoase ale primei copilării.

Scăderea gradului de oxigenare a țesuturilor prin prezența de corpi străini, cheaguri, resturi de țesuturi cu acțiune reductoare la nivelul plăgilor creează condiții favorabile dezvoltării germenilor anaerobi.

Acțiunea diferiților agenți chimici, prin paralizarea unora din mecanismele de apărare, favorizează dezvoltarea infecției, de exemplu alcalinizarea prealabilă a conținutului gastric favorizează infecțiile intestinale.

Rolul dozelor infectante și al căilor de pătrundere a germenilor microbieni în organism

Cantitatea de germeni necesară pentru producerea procesului infecțios variază în raport, pe de o parte, cu gradul de patogenitate a germenului respectiv și cu calea de pătrundere în organism, iar pe de alta, cu starea de receptivitate a acestuia. Cu cît însă infecția este mai masivă, cu atît acțiunea de inhibare asupra forțelor de apărare este mai energică.

Agenții patogeni pot pătrunde în organism pe diferite căi, unele naturale, altele accidentale. Unii germeni microbieni pot produce îmbolnăviri numai cînd pătrunnd pe anumite căi, de exemplu gonococul este patogen cînd este introdus prin mucoasele genitale sau mucoasa conjunctivală, în timp ce pe cale intestinală este inofensiv. Alți germeni sînt patogeni, oricare ar fi calea de intrare, de exemplu *P. pestis*.

Poarta de intrare influențează atît doza infectantă, cît și aspectul clinic și evoluția infecției respective. Astfel, streptococul intrat la nivelul amigdalelor produce un sindrom anginos, la nivelul pielii erizipel, la nivelul uterului infecție puerperală etc.

Dezvoltarea procesului infecțios și tipurile de infecții

O dată pătruns în organism, agentul microbian își dezvoltă acțiunea sa dăunătoare în mod variat, potrivit caracteristicilor sale de patogenitate (virulență, toxigeneză etc.).

Germenii toxigeni fără capacitate invazivă rămîn cantonați la poarta de intrare, unde se multiplică și elaborează produse toxice, care se răspîndesc pe diferite căi, producînd leziuni și tulburînd funcțiile organismului, de exemplu *C. diphtheriae*, *Cl. tetani*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio comma* etc., care produc *infecții de tip toxic*.

Alteori, de la poarta de intrare, bacteriile se răspîndesc în țesuturile învecinate, prinzînd cel mult ganglionii limfatici respectivi; este tipul de *infecție localizată*, de exemplu infecțiile stafilococice, infecțiile gonococice etc.

În cazul germenilor virulenți, cu putere de invazivitate mare, aceștia se răspîndesc rapid pe cale limfatică și sanguină, producînd *infecții generalizate — bacteriemii, septicemii*. Din sînge, germenii se localizează în diferite organe pentru care au afinități speciale, în raport cu organo- și citotropismul lor. La nivelul organelor dezvoltă procese infecțioase secundare, numite focare piemice, infecția în acest caz purtînd numele de *infecție piemică*. De la nivelul focarelor de infecție secundară, germenii pot fi în mod periodic deversați în curentul sanguin, producînd astfel *infecții cu evoluție ciclică*, de exemplu treponematozele, febra recurentă etc.

Căile de eliminare a germenilor microbieni din organismele infectate variază în primul rînd cu localizarea procesului infecțios. Astfel, în infecțiile aerogene germenii sînt eliminați prin spută sau prin secrețiile rinofaringiene, cu care sînt răspîndiți în mediul înconjurător.

În cazul infecțiilor intestinale, germenii sînt eliminați prin materii fecale, bilă.

În infecțiile generalizate, eliminarea se face și prin urină, în timp ce în infecțiile localizate, germenii se găsesc în exsudatele respective.

Perioadele evolutive ale bolilor infecțioase

După pătrunderea agentului microbian în organism urmează o perioadă în care nu se constată nici un semn clinic.

Perioada cuprinsă între momentul pătrunderii germenului în organism pînă la apariția primelor semne de boală constituie *perioada de incubație*. Durata acestei perioade variază în raport cu specia microbiana cu gradul de virulență, cu doza infectantă, cu calea de pătrundere și de răspîndire în organism, cu afinitatea lui pentru anumite țesuturi sau organe, precum și cu gradul de receptivitate a organismului atacat.

Perioada de incubație este urmată de *perioada de debut*, caracterizată prin diferite semne prodromale, dominată mai ales de fenomene generale: frison, cefalee, febră, indicînd o dereglare a echilibrului termic, însoțită de accelerarea bătăilor inimii și a respirației. Urmează *perioada de stare*, cînd tabloului clinic i se adaugă semnele clinice caracteristice organelor afectate și corespunzătoare capacității patogene a germenului respectiv.

În majoritatea bolilor infecțioase se observă modificări sanguine. Simptomele nervoase, tulburările cardiace și vasculare sînt apanajul bolilor care au la baza mecanismului patogenic acțiunea toxinelor.

Durata perioadei de stare este de asemenea variabilă, fiind condiționată de agresivitatea agentului patogen, care rămîne forța motrice principală, de reactivitatea organismului, precum și de sensibilitatea germenului la tratamentele administrate.

Perioadei de stare îi urmează *perioada de convalescență* și vindecare. Vindecarea clinică se poate însoți de vindecarea în sens bacteriologic, în care bacteriile sînt distruse și organismul sterilizat, sau germenii pot persista, în care caz se instalează starea de purtare, care poate fi la rîndul ei temporară (de durată scurtă) sau cronică. Cînd boala nu evoluează în condiții favorabile, procesul infecțios se termină prin moartea macroorganismului.

În afară de această evoluție oarecum tipică, în cursul unei boli infecțioase se pot observa recrudescențe; în cursul convalescenței pot apărea recăderi, iar mai tîrziu reîmbolnăviri sau recidive. În cursul bolii se mai pot observa diferite complicații.

Formele evolutive ale infecțiilor

Condiționate de aceleași elemente: caracterele de patogenitate ale agentului microbian și modul de reactivitate a organismului atacat, bolile infecțioase pot îmbrăca diferite forme de evoluție:

— *infecții aparente*, manifestate prin variate simptome clinice, în raport cu durata și intensitatea fenomenelor morbide; se deosebesc forme medii, forme grave sau forme ușoare, forme acute, subacute sau cronice;

— *infecții abortive sau fruste*, cu simptomatologie redusă și adesea atipică;

— *infecții subclinice*, în care evoluția fiind așa de ușoară, semnele clinice sînt cu totul șterse și numai probele de laborator și probele funcționale pot decela modificări patologice;

— *infecții inaparente* (mute); sînt asimptomatice, decelabile doar prin examene bacteriologice și virusologice. Sînt foarte importante din punct de vedere epidemiologic, constituind surse necunoscute de infecție;

— *infecțiile latente* sînt infecții cu evoluție lentă, asimptomatice, în care agentul patogen rămîne mult timp viabil în organism;

— *starea de microbism latent*, în care agentul patogen, în urma unei boli vindecate clinic, rămîne cantonat la nivelul unui organ sau țesut, unde supraviețuiește în stare latentă. În anumite condiții, el își poate recăpăta virulența, putînd transmite infecția la alți indivizi, de pildă microbismul latent în febra tifoidă.

În raport cu sursa de infecție, se deosebesc: *infecții exogene*, în care agentul patogen pătrunde de la exterior, și *infecții endogene*, în care germenul microbian existent în organism (cavități naturale și patologice, microbism latent etc.) își exaltă la un moment dat virulența, în condiții de slăbire a rezistenței organismului, dezvoltînd o infecție aparentă. În legătură cu infecțiile endogene, Nicolle a introdus noțiunea de „*microbes de sortie*“ cuprinzînd microorganisme existente în flora normală a corpului și care în anumite condiții pot deveni patogene.

Infecțiile produse de o singură specie microbiană se numesc *monomicrobiene* sau *simple* (de exemplu, febra tifoidă). În cazul în care infecția este produsă de două sau mai multe specii microbiene, ea poartă numele de *infecție mixtă* (de exemplu, gangrena gazoasă).

Infecția experimentală este infecția reprodusă în mod voit la animale de laborator, în scopuri multiple:

— în scop de diagnostic (pneumococ, *M. tuberculosis*);

— pentru studiul mecanismului infecţiilor şi al reacţiilor de imunitate;
— chimioterapie experimentală etc.

★

În concluzie procesul infecţios este în esenţă rezultatul interferenţelor şi interacţiunilor reciproce dintre germenul microbian cu multiplele lui capacităţi de agresiune şi macroorganismul, cu gradul lui de receptivitate şi complexitatea funcţiilor lui de apărare.

Tehnici folosite pentru studiul virulenţei şi toxinogenezei

Determinarea gradului de virulenţă

Cercetarea virulenţei unui germen microbian se efectuează, fie după obţinerea lui în cultură pură, fie direct în produsul patologic. Şi într-un caz şi în celălalt se prepară o suspensie în ser fiziologic (dacă cultura de examinat se găseşte în mediu lichid se foloseşte ca atare), care se inoculează la animalul sensibil. Se pot da numeroase exemple: 1) pentru cercetarea virulenţei pneumococilor prezenţi în spută se diluează produsul în ser fiziologic şi se inoculează pe cale subcutanată sau intraperitoneală, la şoarecele de 16 — 20 g. Dacă sputa inoculată conţine pneumococi virulenţi, şoarecele moare în 6 — 24 de ore (în raport cu gradul de virulenţă), cu septicemie pneumococică.

Pentru cercetarea virulenţei *B. anthracis* se inoculează 0,5 ml cultură în bulion în vîrstă de 24 de ore, la şoarece, pe cale subcutanată. Animalul moare cu septicemie cărbunoasă, în primele 24 de ore de la inoculare etc.

După cum s-a arătat, determinarea cantitativă a virulenţei se poate efectua prin stabilirea dozei letale minime — D. L. M. sau, ca o metodă mai exactă, furnizînd rezultate mai aproape de realitate, prin stabilirea D. L.$_{50}$.

Determinarea gradului de virulenţă este folosită în scopuri multiple: controlul tulpinilor care intră în compoziţia vaccinurilor; studiul imunogenităţii unui vaccin în raport cu o anumită doză infectantă; studiul activităţii protectoare a vaccinurilor etc.

Testul de determinare a D.L.M.

Se efectuează o suspensie de densitate anumită în ser fiziologic, din tulpina de cercetat, cultivată 18 ore pe geloză. Densitatea suspensiilor microbiene se determină prin una din metodele recomandate: numărătoarea directă la celula fotoelectrică sau numărătoarea indirectă prin metoda Wright, nefelometric, culturi pe medii lichide şi solide sau determinarea greutăţii germenilor uscaţi. Din suspensia iniţială se efectuează diluţii de la 10^{-1} la 10^{-10}.

După efectuarea suspensiilor microbiene de anumite densităţi se inoculează cu fiecare din ele grupuri egale de animale, aparţinînd unei specii sensibile (animalul cel mai folosit este şoarecele alb). Citirea testului se efectuează după 24, 48 şi 72 de ore.

D. L. M.$_{100}$ este considerată suspensia cea mai slabă care omoară animalele în interval de 72 de ore, în proporție de 100%.

Testul de determinare a D.L.$_{50}$

O metodă simplă, care permite calcularea valorii D.L.$_{50}$, este metoda recomandată de către Reed și Muench sau aceea recomandată de Körber.

Metoda Reed și Muench necesită un număr de diluții din suspensia microbiană de cercetat, suficient pentru a cuprinde toată scara de reacții, de la 0% la 100%.

Plecîndu-se de la considerentul că animalele care au murit după inocularea unei anumite diluții ar fi murit fără îndoială și la diluțiile mai mici, și că animalele care au supraviețuit la o anumită diluție ar fi supraviețuit desigur și la diluțiile mai mari, se stabilesc valorile cumulative pentru numărul total de animale care mor sau supraviețuiesc. Exemplificarea acestei produceri de acumulare este ilustrată în tabelul VII.

Într-adevăr, adunînd în direcția arătată de săgeți, se capătă, pentru fiecare diluție, valorile cumulative exprimînd letalitatea (coloana *e*), sau supraviețuirea (coloana *f*) animalelor inoculate.

Procentul letalității se calculează pentru fiecare diluție, raportînd cifrele letalității cumulative la suma cifrelor supraviețuirii și letalității cumulative corespunzătoare diluției respective (coloanele *g* și *h*).

Tabelul VII

Diluția suspensiei microbiene (*a*)	Raportul letalității reale (*b*)	Morți (*c*)	Supraviețuitori (*d*)	Date cumulative Letalitatea cumulativă (*e*)	Supraviețuirea cumulativă (*f*)	Raportul letalității cumulative (*g*)	Letalitate (%) (*h*)
10^{-1}	6/6	6 ↑	0	17	0	17/17	100
10^{-2}	6/6	6	0	11	0	11/11	100
10^{-3}	4/6	4	2	5	2	5/7	71
10^{-4}	1/6	1	5	1	7	1/8	13
10^{-5}	0/6	0	6 ↓	0	13	0/13	0

În cazul nostru, pentru a stabili diluția care determină o letalitate de 50% (D.L.$_{50}$) se va ține seama de faptul că această diluție se situează undeva între diluția 10^{-3} (71% letalitate) și diluția 10^{-4} (13% letalitate).

Stabilirea prin calcul a valorii D.L.$_{50}$ se efectuează după următoarea formulă:

$$\frac{\text{procentul letalității la diluția superioară cea mai apropiată de } 50\% \text{ minus } 50}{\begin{array}{c}\text{procentul letalității la diluția superioară}\\ \text{cea mai apropiată de } 50\%\end{array} \text{ minus } \left\{\begin{array}{c}\text{procentul letalității la diluția inferioară}\\ \text{cea mai apropiată de } 50\%\end{array}\right.}$$

sau, în cazul nostru:

$$\frac{71-50}{71-13}=0{,}36$$

Cifra 0,36 reprezintă coeficientul de corecție proporționată (coeficientul de proporționalitate) și ne este necesară în calculul ce urmează pentru stabilirea valorii $D.L._{50}$. Operațiile sînt ușurate prin aplicarea calculului logaritmic, și anume pentru a obține logaritmul diluției care dă o letalitate de 50% trebuie adăugat la logaritmul diluției superioare, care dă letalitatea cea mai apropiată de 50%, logaritmul bazei diluției înmulțit cu coeficientul de proporționalitate, adică:

$$[\log D.L._{50} = \log. 10^3 + [(\log. 10) \times 0{,}36] = 3 + (1 \times 0{,}36) = 3{,}36.$$

Deci, în exemplul nostru, logaritmul diluției căutat este 3,36. Antilogaritmul acestei valori este 2300, adică diluția din suspensia de microbi care determină letalitatea de 50% este egală cu 1/2 300.

Determinarea gradului de virulență pe embrionul de găină. Studiul invaziei bacteriene a embrionului de găină a fost preconizat încă de la lucrările lui Goodpasture și colaboratorii (1937) și mai tîrziu, ale lui Weil și Gall (1941). Grabar și Le Minor (1951) au folosit metoda între altele pentru studiul sensibilității oului embrionat față de anumite salmonele.

Tehnica recomandată: se folosesc ouă fecundate, de aceeași rasă, provenind de la aceeași fermă, cu embrioni de 11—15 zile.

Tulpina de cercetat, cultivată 18 ore pe geloză 2% înclinată, este suspensionată în ser fiziologic. Se determină densitatea suspensiei la celula fotoelectrică sau prin nefelometrie, eventual cu controlul ulterior prin însămînțări și numărare de colonii. Se efectuează apoi diferite diluții, pentru a se obține suspensii cu conținut microbian diferit (20—200 germeni/ /ml). Inoculările se fac pe membrana corioalantoidă, în volum de 0,2 ml. După inoculare și închiderea ouălor, acestea sînt reincubate la 39° timp de 3 zile, după care se procedează la deschiderea lor și numărarea embrionilor vii și morți. Din ouăle moarte se fac însămînțări pe medii de cultură, pentru a controla cauza morții, evitînd erorile produse de eventualele contaminări accidentale.

Evaluarea rezultatelor se face după metoda Reed și Muench, stabilind valoarea $D.L._{50}$.

Amănunte privind inoculările pe oul embrionat se găsesc în capitolul „Rickettsii și rickettesioze".

Cercetarea toxicității unui germen

1. **Pentru aprecierea în general a toxicității** unei tulpini microbiene se folosesc teste biologice pe animale sensibile, efectuate cu suspensii microbiene omorîte prin căldură.

Culturi pe geloză, în vîrstă de 24 de ore, sînt suspensionate în ser fiziologic, după care sînt încălzite timp de 60 de minute la o temperatură capabilă să omoare germenii respectivi (pentru majoritatea speciilor microbiene la 59—60°). După inactivarea suspensiei se efectuează controlul de sterilitate și se aduce suspensia la anumite densități prin diluare cu ser fiziologic, sub control nefelometric.

Se folosesc de obicei suspensii conținînd 500 milioane, 1 miliard și 2 miliarde, din care se inoculează, pe cale intraperitoneală sau pe alte căi, 0,5—1 ml în raport cu specia animală sensibilă (pentru șoarece, 0,5 ml). Pentru fiecare diluție se folosesc grupe egale de animale.

O tulpină microbiană este considerată netoxică, cînd animalele supraviețuiesc.

Se apreciază gradul de toxicitate după numărul animalelor decedate și dozele care au provocat moartea.

2. **Cercetarea producerii de toxină prin testul Elek-Ouchterlony-Frobisher** (testul de precipitare în gel). Este o metodă simplă, descrisă pentru cercetarea capacității toxigene a *C. dyphtheriae*, aplicabilă și pentru alți germeni care elaborează exotoxine. Principiul metodei se bazează pe precipitarea toxinei elaborate de cultura de cercetat, în prezența antitoxinei, ambele difuzînd în gel. Reacția este pusă în evidență prin apariția unor benzi de precipitare la nivelul întîlnirii toxinei cu antitoxina.

Descrierea amănunțită a metodei este redată în capitolul C. *diphtheriae*.

3. **Cercetarea activității exotoxinelor** se efectuează *in vivo* și *in vitro*.

a) *Titrarea unei toxine „in vivo"* se face diferit după cum este vorba de toxină difterică, tetanică, stafilococică etc. Acestor toxine li se poate determina activitatea prin determinarea D.L.M. (doza limită mortală), prin D.L.$_{50}$ (doza limită 50%), prin D.M.H. (doza minimă hemolitică) etc.

— *Determinarea D.L.M.* se efectuează mai ales pentru titrarea toxinei difterice. Pentru această titrare se procedează în felul următor : se fac diluții din toxina supusă titrării, astfel ca să avem pe ml cantități precise, care sînt inoculate subcutanat la cobai. Animalele trebuie să aibă greutatea între 230 și 280 g ; ele sînt urmărite după inoculare timp de 4 zile (tabelul VIII).

Tabelul VIII

Protocol de titrare a toxinei difterice

Doză în ml	Rezultat	Doză în ml	Rezultat
0,03	moartea în 36 de ore	0,005	moartea în 4 zile = D.L.M.
0,02	moartea în 36 de ore	0,004	moartea în 6 zile
0,01	moartea în 2 zile	0,003	moartea în 8 zile
0,008	moartea în 3 zile	0,002	Paralizii tardive
0,006	moartea în 3 1/2 zile	0,001	Sănătoși după 15 zile

Determinarea D.L.$_{50}$ se folosește mai ales pentru titrarea toxinelor elaborate de germeni anaerobi. Pentru aceasta se procedează în felul următor : se fac diluții în ser fiziologic, în raport cu activitatea diferitelor toxine. Ca animal de titrare servește șoarecele alb în greutate de 16—18 g. După felul toxinei supusă titrării (*Cl. perfringens*, *Cl. septicus*, *Cl. oedematiens*, *Cl. tetani*), administrarea de toxină se face respectiv intravenos, intramuscular sau subcutanat. Diluțiile de toxină sînt inoculate sub volum de 0,5 ml. Se folosesc un număr cît mai mare de animale pentru fiecare diluție.

Pentru calcularea D.L. se folosește metoda Reed și Muench (vezi capitolul „Determinarea gradului de virulență").

b) *Determinarea D. M. H.* Se folosește pentru titrarea toxinei stafilococice. Se procedează în felul următor : din toxina diluată 1/10—1/10 000 se repartizează 1 ml într-un tub, pentru fiecare diluție. Se adaugă apoi în fiecare tub cîte 1 ml ser fiziologic $8{,}5^0/_{00}$. În fine, se mai adaugă cîte 0,1 ml hematii de iepure spălate, dintr-o suspensie diluată 1/5. Se agită, se incubează 30 de minute la 37° ; se agită apoi tuburile și se incubează încă 30 de minute la 37°. După aceasta, tuburile sînt menținute la + 4° și se citește hemoliza a doua zi. D.M.H. este cantitatea cea mai mică de toxină capabilă să provoace o hemoliză completă a hematiilor.

Tabelul IX

Diluția de toxină	1/10	1/100	1/200	1/400	1/500	1/1 000	1/2 000	1/4 000	1/5 000	1/10 000
Toxină diluată (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ser fiziologic $8{,}5^0/_{00}$ (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hematii de iepure diluate 1/5 ml	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Rezistenţa naturală faţă de infecţie

Conf. N. Pozsgi

Rezistenţa naturală sau imunitatea naturală faţă de infecţie este starea de nereceptivitate nespecifică a organismului, condiţionată de un complex de factori ereditari proprii speciei, în scopul apărării animalului sau omului faţă de infecţie. Printre factorii determinanţi ai stării de rezistenţă, un loc important îl ocupă o serie de proprietăţi biologice (constituţia anatomică şi fiziologică) apărute ca rezultat al procesului de evoluţie, de adaptare în procesul dezvoltării filogenetice, cît şi cele dobîndite individual, în timpul vieţii. Imunitatea naturală, în raport cu treptele dezvoltării speciei este diferită; ea este caracteristică speciei, poate varia în interiorul acesteia în funcţie de condiţiile de viaţă şi de dezvoltare a organismului şi chiar la acelaşi individ.

Ca rezultat al evoluţiei s-au stabilit anumite raporturi de adaptare reciprocă între macro- şi microorganism, încît în organismul omului şi al animalelor se găsesc mijloace puternice de apărare contra pătrunderii şi multiplicării germenilor patogeni sau a acţiunii toxinelor lor.

Echilibrul armonios al întregului complex de factori în interacţiune — buna stare fiziologică a organismului — realizează capacitatea normală de apărare împotriva infecţiei.

Principalele proprietăţi biologice care joacă rol în mecanismul de apărare faţă de microbul patogen sînt barierele cutanate şi mucoase, inflamaţia şi fagocitoza, sistemul reticulo-endotelial, factorii umorali, funcţia de barieră a ţesutului limfatic, areactivitatea celulară etc.

Barierele cutanate şi mucoase

Pielea. Organismul cu sistemul lui celular este apărat de mediul înconjurător prin piele, mucoase, care împreună formează prima linie de apărare faţă de germenii patogeni. Prin structura sa anatomică, pielea intactă, sănătoasă, este mai mult decît o barieră mecanică pentru majoritatea speciilor microbiene; ea posedă o importantă acţiune autosterilizantă.

În cazuri foarte rare, unii germeni patogeni, ca de pildă *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Treponema pallidum*, pătrund probabil şi prin pielea intactă.

De asemenea se pot produce infecţii prin canaliculele glandelor sebacee şi sudoripare, ale foliculilor piloşi, ca de exemplu în cazul stafilococului, streptococului etc.

Acţiunea sterilizantă a pielii a fost demonstrată prin numeroase experienţe. Astfel, Colebrook (1930), umectînd pielea normală cu o cultură în bulion de streptococ hemolitic a găsit, prin numărătoare :

— după 3 minute	30 milioane coci
— după o oră	1 722 000 coci
— după 2 ore	7 000 coci

Rezultate asemănătoare au fost constatate şi cu *Proteus vulgaris*, *Esch. coli*, *S. Typhi*, *Ps. pyocyanea*; se distrug în 10 minute.

Pielea diferitelor suprafeţe ale corpului posedă o putere autosterilizantă diferită : pe dosul mîinii este mai puţin activă, pe regiunea palmară este mult mai pronunţată. De asemenea acţiunea autosterilizantă este influenţată de gradul de curăţenie ; pe cînd numărul *S. enteritidis* pe pielea mîinii murdare scade cu 5% în 20 de minute, pe pielea curată mor 100% în 20 de minute.

Speciile microbiene faţă de care pielea normală exercită acţiunea autosterilizantă nu fac parte din flora normală a pielii, de exemplu stafilococul citrin, microb al florei normale, se izolează aproape constant de pe pielea mîinilor.

Acţiunea autosterilizantă este proprie numai tegumentelor organismului viu şi dispare la 15 minute după moarte.

Mecanismul autosterilizant este datorit acidităţii pielii, produsă de acizii graşi nesaturaţi, mai ales acidului oleic, acidului lactic (pH fiind între 5 şi 3) ; extractele obţinute din piele conţin acizi graşi şi săpunuri, avînd acţiune bactericidă faţă de *Str.pyogenes*, *C. diphtheriae*, *Esch. coli* etc.

Mucoasele, datorită structurii lor şi a secreţiilor pe care le elaborează, constituie o barieră cu acţiune complexă. Astfel mucoasele nazo-faringiene şi ale tractului respirator reţin particulele străine şi bacteriile, încît numai puţine dintre cele mai fine ajung în ultimele ramificaţii ale bronhiolelor sau la nivelul alveolelor. Suprafaţa unora dintre mucoase este ciliată şi acoperită cu mucus dispus într-un strat continuu protector, în continuă mişcare, datorită căruia particulele sînt eliminate la exterior.

Saliva posedă o acţiune bactericidă. Stomacul, prin aciditatea sa, constitue o importantă barieră de protecţie. Puţine sînt microorganismele care pot rezista acidităţii sucului gastric (bacilii acidofili, *Torrula*). Posibilitatea trecerii microbilor în cursul alimentaţiei este mai mare şi scade după masă.

Bila şi sucul pancreatic conferă conţinutului intestinal o acţiune antitoxică pronunţată.

Uretra este sterilă, datorită urinii uşor acide şi acţiunii mecanice de spălare, iar secreţia vaginală normală este acidă şi bactericidă faţă de numeroşi germeni.

La nivelul conjunctivelor oculare, germenii microbieni şi particulele străine sînt îndepărtate rapid prin spălarea continuă cu ajutorul lacrimilor care conţin o enzimă numită lizozim.

Lizozimul

Descoperit de Fleming în 1922, este o proteină bazică, cu un mare conţinut de arginină, cu greutate moleculară mică, de natură enzimatică şi cu o importantă acţiune bactericidă. Se găseşte în lacrimi, în secreţiile nazale, salivă, lapte, plasmă, ser sanguin, urină, lichid peritoneal, leucocite, albuş de ou, cartilaje ; în cea mai mare concentraţie se află în lacrimi, albuş de ou şi în cartilaje. Lizozimul din lacrimi poate acţiona în diluţii pînă la 1 : 10 milioane. Lizozimul nu se găseşte în lichidul cefalorahidian, creier, sudoare, urină şi la nou-născuţi în primele două zile după naştere.

N.P.Laşcenkov (1909) a pus în evidenţă acţiunea bactericidă a albuşului de ou de găină asupra *B. subtilis*.

Germenele cel mai sensibil la acţiunea litică a lizozimului este *Micrococcus lysodeikticus*, izolat din aer de către Fleming. Lizozimul prezintă acţiune litică, în primul rînd faţă de microbii saprofiţi. La microscopul electronic se observă dizolvarea enzimatică a peretelui celular prin depolimerizarea şi hidroliza mucopolizaharidului (acetilaminopolizaharid), care se găseşte în ţesuturile animale şi în unele celule bacteriene. Lizozimul acţionează şi asupra unor microbi patogeni, de exemplu stafilococul, pneumococul, meningococul, streptococul hemolitic, clostridiile gangrenei gazoase, cărbunele etc.

Activitatea sa maximă se manifestă la pH 7,2, creşte cu ridicarea temperaturii pînă la 50° după care scade.

Rolul şi importanţa lizozimului se observă în protecţia pe care o conferă mucoasei conjunctivelor oculare, bucale, nazale, corneei, suprafeţe care sînt în contact permanent cu un mare număr de germeni, din atmosferă. Se ştie cît de repede se vindecă rănile din gură ; pe de altă parte lingerea rănilor de către animale, pe lîngă că îndepărtează mecanic germenii patogeni, introduce totodată şi lizozimul.

Flora normală

Pe piele, mucoase şi în cavităţile cu deschidere exterioară, se întîlneşte o floră normală, permanentă, destul de variată şi bogată.

Flora microbiană a pielii este compusă din stafilococi, bacili pseudodifterici etc.

În faringe, laringe şi în căile aeriene superioare, de cele mai multe ori se găsesc stafilococi, pneumococi, uneori *Str. viridans*, *Haemophilus*, *B. friedländeri*, bacili pseudodifterici etc. Ultimele ramificaţii ale bronhiilor şi alveolelor pulmonare sînt în mod normal sterile, în unele cazuri germenii pot să ajungă pînă la nivelul bronhiolelor celor mai mici şi în alveole.

În cavitatea bucală se găseşte o floră microbiană bogată : *Leptothrix buccalis*, *Bacterium maximus buccalis*, diferiţi coci, *Spirochaeta buccalis*, *Spirochaeta dentium*, *Lactobacillus* etc. *Streptococcus viridans* produce H_2O_2 prin intermediul căruia se inhibă dezvoltarea *C. diphtheriae*.

În tractul digestiv, flora este diferită. Astfel, stomacul normal este steril, ca urmare a acidităţii. Începînd cu duodenul, unde conţinutul începe să devină alcalin sub acțiunea sucului pancreatic și a bilei, mediul devine mai favorabil dezvoltării microbilor, care, în intestinul gros, sînt foarte numeroși și variați.

La nou-născut, tubul digestiv în primele ore după naștere este încă steril, dar după 10—12 ore, germenii microbieni pătrund din mediul ambiant, mai ales prin intermediul mamei și timp de 2—3 zile microflora are un caracter accidental. În continuare, pînă la 8—12 luni cît ține alăptarea naturală domină *Lactobacillus bifidus*. Acest germen este un anaerob gram-pozitiv, ramificat, polimorf, cu rol important în apărarea sugarului în primul an de viață, față de diferite tulburări digestive. Treptat *L. bifidus* este înlocuit de *Esch. coli*, *Proteus vulgaris*, anaerobi (*Cl. sporogenes*, *Cl. putrificus*, *Cl. perfringens* etc.), *Enterococcus* etc.

Compoziția florei intestinale prezintă variații mici, provocate de felul alimentației, de vîrstă etc.

Pe conjunctiva oculară se găsesc *Stafilococcus albus*, *C. xerozis*.

În mod normal, uretra atît la bărbat, cît și la femeie, este sterilă. În vagin se găsește mai ales *Bacillus döderleini*, bastonaș gram-pozitiv, acidofil. Din această cauză, secreția vaginală normală are o acțiune bactericidă față de numeroase specii bacteriene, dispariția acestui germen putînd fi întovărășită de apariția proceselor patologice.

Microflora normală a corpului omenesc are un rol deosebit în apărarea organismului și constituie o importantă componentă a rezistenței complexe a organismului. Prin intermediul antagonismului microbian, mai evident în tractul intestinal, unde agentul patogen trebuie să facă față concurenței microflorei normale care posedă acțiune protectoare, virulența, antigenicitatea, proprietățile de cultură etc. ale germenilor microbieni se modifică. Astfel, *Esch. coli* este un antagonist al *S. typhi*, al germenilor din genul *Shigella*, al stafilococului, streptococului etc.

Microflora normală nu este vătămătoare atîta vreme cît rezistența gazdei este menținută la un nivel convenabil. De exemplu, în cazul cînd, prin administrare de antibiotice, rezistența este redusă și echilibrul răsturnat, se tulbură funcția de apărare a microflorei normale și unii germeni mai virulenți pot invada țesuturile, provocînd infecții. De pildă în tratamentul cu cloromicetină crește frecvența infecțiilor cu *Candida albicans* și scade procentul bacililor gram-negativi și gram-pozitivi din intestin.

Radiațiile ionizante rup bariera normală pe care o formează mucoasa intestinală și favorizează invazia în țesuturi a microbilor intestinali.

Factorii umorali ai imunității naturale

În organism, soarta germenilor microbieni este diferită ; ei pot să fie distruși datorită prezenței în umorile organismului a unor principii de natură bactericidă, sau acțiunii unor anumite categorii de celule (leucocite, celule ale sistemului reticulo-endotelial) cu capacitate de înglobare și distrugere prin procesul fagocitozei.

Fodor (1887) a observat, pentru prima oară, că sîngele animalelor are proprietăți bactericide față de *B. anthracis*. Injectînd germeni saprofiți sau slab patogeni pe cale intravenoasă, la diferite specii animale, acest autor a observat că germenii erau rapid distruși și nu mai puteau fi izolați prin hemocultură.

Ceva mai tîrziu, Buchner (1890) a demonstrat existența capacității bactericide a serului sanguin normal, legată de prezența unei substanțe, pe care a denumit-o alexină (alexo = apăr). În cercetări ulterioare s-a constatat atît în serul sanguin, cît și în alte umori, prezența, alături de alexină, și a altor substanțe bactericide cum sînt lizozimul, betalizina, anticorpii naturali, properdina etc.

Iradierea cu ajutorul razelor Roentgen provoacă o scădere marcată a capacității bactericide a serului sanguin. De asemenea tulburarea metabolismului proteic — de exemplu în formele de agammaglobulinemie, hiperglobulinemie — duce la scăderea rezistenței organismului.

Betalizinele, leucinele și plakinele. Cu ocazia studiului substanțelor bactericide din serurile diferitelor specii animale a fost descoperită o substanță bactericidă termostabilă denumită β-lizină (α-lizina fiind numele dat alexinei de către Pettersson). Substanța este activă în absența sărurilor, se distruge sub influența razelor ultraviolete și se conservă la 4°. β-lizina se găsește într-o concentrație mai mare la șobolani, iepure, cal, oaie, bou, cîine. Ca urmare a acestui fapt, șobolanii prezintă o proprietate bactericidă mai accentuată față de *B. anthracis*.

Cercetările efectuate asupra extractelor obținute din leucocitele polimorfonucleare arată că acestea posedă o acțiune bactericidă față de numeroase microorganisme. Unele din substanțele bactericide, extrase din leucocite, sînt termostabile, se distrug între 75° și 80° și sînt precipitate cu alcool și eter. Aceste substanțe au fost numite de Schneider leucine. Leucinele provoacă moartea germenilor gram-pozitivi fagocitați; ele sînt eliberate în mediul exterior numai după moartea leucocitelor. Alte substanțe bactericide extrase sînt termolabile, acționează mai ales asupra germenilor gram-negativi și se numesc fagocitine.

Substanțe asemănătoare leucinelor au fost extrase și din trombocite. Aceste substanțe au fost denumite plakine și provin din nucleoproteine.

Betalizinele, leucinele și plakinele sînt de natură globulinică.

Alexina pusă în evidență în serul normal, proaspăt, de către Buchner, a fost denumită de Ehrlich, *complement*. Se găsește în serurile normale și imune ale majorității animalelor cu sînge cald și rece, într-o concentrație constantă pentru fiecare specie. Serul de cobai conține cea mai mare și constantă cantitate de alexină. Prezența ei nu este condiționată de răspunsul imunologic; ea nu crește prin imunizarea animalelor. Nu se găsește în lichidul de edem prin stază, în umoarea apoasă, în lichidul cefalorahidian.

Se distruge prin încălzire la 56°, timp de 30 de minute, prin expunere la razele solare direct; razele ultraviolete o inactivează repede. Dacă se adaugă unui ser proaspăt, inactivat prin încălzire, puțin ser proaspăt neinactivat, serul inactivat își recapătă activitatea prompt. Alexina se distruge prin păstrare, dispariția făcîndu-se mai lent la temperaturile joase, ca și prin agitare. Inactivarea alexinei se mai poate obține prin adsorbție pe substanțele coloidale, suspensii bacteriene, pe substanțe organice în general. Se conservă la temperaturi joase, prin liofilizare sau prin adăugare de ClNa în soluție saturată.

Alexina provoacă liza antigenelor sensibilizate.

Complementul sau alexina posedă structura unei proteine complexe. Ea pare să fie sintetizată în mare parte în ficat, deoarece în afecțiunile hepatice (icter, ciroză, intoxicație cu fosfor, cu cloroform, extirpare etc.) se constată scăderea sau chiar dispariția ei totală.

Structura alexinei : alexina este constituită dintr-un complex de fracțiuni legate de proteinele serului sanguin.

Înlăturîndu-se electroliții, prin dializa serului proaspăt de cobai în prezența apei distilate, se obțin două componente termolabile : prima, formată dintr-o globulină labilă, euglobulina, precipită ; a doua, formată din mucoeuglobulină, rămîne în lichidul supernatant. Aceste două componente sînt inactive, dacă sînt adăugate separat la un sistem hemolitic. Ulterior s-a constatat că pe lîngă aceste două fracțiuni termolabile, alexina mai conține încă două componente termostabile ; acestea sînt cunoscute sub numele de fracțiunile a 3-a și a 4-a. Veninul de cobra, drojdia de bere fac inactivă alexina, datorită combinării lor cu fracțiunea a 3-a, care este probabil o lipoproteină sau un lipid. Amoniacul, sulfatul de sodiu și solvenții lipoizilor distrug componenta a 4-a, care este probabil o mucoeuglobulină.

După Pillemer, cele 4 componente au următoarea compoziție chimică.

C'_1 — euglobulină, conținînd 27 % glucide
C'_2 C'_4 — mucoglobuline, conținînd 10,3 % glucide
C'_3 — probabil o lipoproteină sau un lipid.

Componentele alexinei sau complementului (C′) se notează cu litere și cifre C_1', C'_2, C'_3, C'_4 ; componenta C'_3, după unele cercetări, ar fi formată din trei fracțiuni distincte a, b, c. Aceste componente se întîlnesc în proporții variate în serurile diferitelor animale. Astfel în serul de cobai și de om se găsesc în cantități mai mici C'_2 și C'_3. Titrul alexinei este dat de fracțiunea care se găsește în cantitatea cea mai mică. În complexul antigen-anticorp greutatea de proteine reprezentată de alexină este de 200-400 µg mililitru.

Adsorbția complementului de către complexul antigen-anticorp (în cazul complementului de cobai și al eritrocitelor de oaie și al anticorpilor specifici antieritrocite) se produce în patru faze :

1. Celulele sensibilizate se combină cu C'_1 și C'_4 în prezența ionului calciu.

2. Complexul format se combină mai departe cu C'_2 în prezența magneziului.

3. Complexul final se combină cu C'_3 a,b, c.
4. Liza celulei cu complement.

Se consideră că C'_1 manifestă o activitate enzimatică esterazică asupra complexului antigen-anticorp în prezența celorlalte componente C'_4, C'_2, C'_3, a, b, c.

Properdina este o proteină serică, izolată de Pillemer în 1954. Joacă un rol în imunitatea naturală prin distrugerea *in vivo* a unor bacterii gram-negative, a unor protozoare etc.

Properdina este inactivată prin combinarea ireversibilă cu o substanță denumită zimozan, extrasă din celulele de drojdie de bere supuse digestiei triptice. Zimozanul este constituit mai ales din hidrații de carbon ai peretelui celular al drojdiei.

Properdina se combină cu zimozanul în prezența C'_1, C'_4 și Mg^{++}, iar în faza a doua complexul properdină-zimozan inactivează componenta C'_3 la 37°, ca rezultat final complementul își pierde puterea hemolizantă.

În urma combinării properdinei cu bacteria întreagă se pare că toate cele 4 componente sînt fixate.

În afară de zimozan mai sînt şi alte substanţe capabile să fixeze properdina şi să inactiveze C′ : hidrocarbonatele, dextranul, membranele celulare ale bacteriilor, lipopolizaharidele etc.

Properdina este o euglobulină, cu constanta de sedimentare 19 S, reprezentînd 0,02 % din totalul proteinelor serice din serul uman.

Properdina singură este inactivă, acţionează în asociaţie cu componentele alexinei, în prezenţa Mg^{++} şi a temperaturii. Posedă acţiune nespecifică ; inocularea de un lipopolizaharid măreşte rezistenţa faţă de o serie de germeni gram-negativi.

Unii cercetători consideră că properdina ar reprezenta un complex de anticorpi naturali, ce au apărut spontan în cursul existenţei, ca un rezultat al dezvoltării florei normale a corpului.

După iradierea puternică a şobolanului se constată o scădere a properdinei în ser, care poate merge pînă la 70 %. Properdina pare să protejeze animalele contra bolii de iradiaţie. Se observă un paralelism între dispariţia properdinei şi apariţia de infecţii.

Obsistina, bactericidina. În serul normal s-au pus în evidenţă obsistina, un principiu litic, termorezistent, care acţionează asupra pereţilor bacteriilor gram-negative şi bactericidina care atacă de asemenea bacilii gram-negativi şi necesită pentru activitatea sa prezenţa calciului. *Factorul detoxifiant al endotoxinelor*, termolabil, acţionează asupra endotoxinelor. Toţi aceşti factori acţionează fără contribuţia alexinei.

Anticorpi naturali sau normali. În serul animalelor sau al omului care nu au trecut prin boală sau nu au fost vaccinaţi specific au fost puşi în evidenţă anticorpi denumiţi normali sau naturali. Manifestările anticorpilor naturali sînt aceleaşi cu ale anticorpilor dobîndiţi : aglutinare, liză, opsonizare. Anticorpii normali sînt întîlniţi, de obicei, în titru scăzut, iar imunitatea specifică produsă de ei este scăzută. Anticorpii naturali sînt de natură globulinică.

S-a pus întrebarea, dacă anticorpii normali pot fi formaţi în absenţa stimulului antigenic. Este stabilit azi că formarea anticorpilor normali sau naturali este posibilă în absenţa antigenului ; proba o constituie apariţia şi menţinerea izohemaglutininelor. Această formare a anticorpilor normali este numai un caz particular, în toate celelalte cazuri apariţia globulinei-anticorp pare posibilă numai sub influenţa antigenului.

Apariţia de anticorpi normali poate fi provocată de infecţiile inaparente, indivizii în cursul vieţii fiind expuşi permanent la contactul şi acţiunea diferitelor antigene. Chiar microorganismele florei normale a corpului uman ar procura un bogat şi permanent izvor de stimuli antigenici.

Este cunoscută apariţia de anticorpi în afara unei infecţii clinice evidente. Un exemplu poate să-l constituie antitoxinele difterice apărute şi existente în sîngele oamenilor care nu au contractat niciodată difteria. Procentul de reacţii Schick negative, care creşte cu vîrsta, este datorit producerii de anticorpi antitoxici prin infecţiile inaparente ale purtătorilor de bacili difterici. Anticorpii normali sau naturali sînt, cu mare probabilitate, anticorpi dobîndiţi.

Factorii hormonali

Hormonii joacă un rol important în homeostazie şi deseori s-a observat că tulburările funcţionale care au la bază un dezechilibru hormonal favorizează scăderea rezistenţei, predispunînd la infecţii, exemplu diabetul zaharat, hipotiroidismul, hipo- şi hiperadrenalismul. Schimbările hormonale în graviditate acţionează ca factori predispozanţi la infecţie (bacteriurie).

S-a stabilit că faţă de hormonii organismului uman şi animal, comportarea diferitelor microorganisme nu este uniformă.

Este neîndoielnic că hormonii au o influenţă asupra interacţiunii dintre microbi şi ţesuturile organismului în procesul infecţiei şi al imunităţii.

Grupul hormonilor adreno-corticali are cea mai mare importanţă, căci contribuie într-o măsură destul de mare la scăderea rezistenţei. Aceşti hormoni au un efect de inhibare a procesului inflamator, probabil prin scăderea permeabilităţii vaselor mici şi activităţii celulelor macrofage (sistemul reticulo-endotelial); scad intensitatea participării acestor celule în mecanismul rezistenţei, scad răspunsul în anticorpi.

În cazul cînd la bolnavi cu infecţii acute se administrează hormonul adreno-corticotrop (ACTH) sau cortizon se constată o rapidă defervescenţă a simptomelor severe, însă microorganismul nu este interesat, germenii se pot disemina — apărînd infecţii (focare) secundare fără simptome evidente.

Aceşti hormoni accentuează de asemenea efectul endotoxinelor, prin interferenţa lor cu activitatea celulară şi a mecanismului de detoxifiere. În cazul apariţiei unei infecţii, întreruperea tratamentului cu ACTH şi cortizon se impune.

Factorii tisulari

Substanţele cu efecte antimicrobiene s-au izolat şi din ţesuturile şi organele normale ale animalelor. Astfel, s-au obţinut substanţe solubile în apă din extractele saline de splină, timus, pancreas, tiroidă de viţel, de porc etc., de natura polipeptidelor bazice care conţin mici cantităţi de lizină şi arginină, care s-au dovedit active faţă de *B. anthracis*, *Esch. coli*, *Stafilococcus*, *Streptococcus pyogenes*. Din eritrocitele de om, de bovidee s-a izolat o polipeptidă cu acţiune antimicrobiană faţă de *C. diphtheriae*. În exsudatele inflamatoare ale plămînului se găsesc de asemenea polipeptide, care acţionează faţă de pneumococ, iar extractele de ţesut renal de la bovidee acţionează contra *M. tuberculosis*. La fel s-a constatat că nucleinele, histonele, protaminele, acizii graşi şi esterii lor, au o acţiune antibacteriană.

Din ficatul şi splina de şobolan, cobai, se obţin substanţe de natură lipidică, solubile în solvenţii organici şi care au efect antipneumococic.

În laptele de femeie, oaie, vacă s-a pus de asemenea în evidenţă un principiu bactericid faţă de streptococul hemolitic numit lactenina. Saliva, cu o bogată floră microbiană cu acţiune antagonică, posedă o activitate antibacteriană faţă de streptococii hemolitici, stafilococi, *C. dyptheriae*.

În rezistența înnăscută enzimele din țesuturi și umori au un rol important. Astfel șoarecele este rezistent față de *M. tuberculosis*, deoarece țesuturile sale conțin multă fosfatază și lecitinază, prin care acționează asupra fosfatidelor bacilare.

Imunitatea celulară

Inflamația

Un mecanism deosebit de important pe care-l utilizează organismul în apărarea contra agenților infecțioși este acela al fagocitozei, propriu unei serii de celule mezenchimale.

Activitatea fagocitară a acestor celule a fost observată de mai mulți cercetători. Astfel, Naegeli și Buchner, precum și Panum (1874) sînt printre primii cercetători care au bănuit existența unei legături între aceste celule și capacitatea de apărare contra infecțiilor.

Prin studii comparative asupra digestiei și inflamației la diferite grupe de animale, situate pe trepte diferite ale scării zoologice, Mecinikov a constatat că funcția nutritivă de înglobare și digestie intracelulară se întîlnește la întreaga serie de animale inferioare, iar reacția față de agentul inflamator este înglobarea și digerarea, adică fagocitoza (fagos = hrană, cytos = celulă), care corespunde funcției de nutriție. La pluricelulare, celenterate, spongieri etc. apar celule mobile cu funcție fagocitară. La animalele superioare și la om, digestia devine extracelulară, în schimb, unele din celulele mezenchimale păstrează proprietatea de a executa mișcări amiboide, de înglobare și digerare a germenilor microbieni sau a altor particule. Digestia alimentară intracelulară pierde din importanță pe scara animală, fiind înlocuită de rolul acestor celule în apărare. Fagocitoza deci se întîlnește pe diferite trepte ale scării zoologice, dar cu roluri diferite.

Pentru a se demonstra rolul unor celule mezenchimale în apărare, Mecinikov (1892) a făcut experiențe pe animale transparente, exemplu larva stelei de mare — *Bipinaria asterigena*, *Rhizostomum cuvieri*. Introducînd o țepușă de lemn, în organismul larvei, Mecinikov a constatat apariția unei opacități alburii în jurul ei, formată din numeroase celule amiboide, mobile. Dacă țepușa a fost colorată cu carmin, granulele de colorant apar în protoplasma acestor celule. Mecinikov consideră că aceste celule au un rol în apărarea organismului și că există o asemănare cu formarea de puroi la om și animale în cursul procesului inflamator.

Conflictul dintre organismul-gazdă și microorganism, cu punerea în evidență a funcției de apărare a unor celule fagocitare de origine mezenchimală, s-a observat și la un mic crustaceu transparent, *Daphnia magna* (puricele de baltă) infectat cu ciuperca microscopică *Monospora bicuspidata*. Crustaceul, o dată cu hrana, înghite și spori ai ciupercii, care trec prin pereții intestinului în cavitatea generală, unde sînt înglobați și digerați. Dacă sporii sînt numeroși, ei nu mai pot fi înglobați în totalitate; o parte din ei germinează, dînd forme vegetative, care omoară animalul. Aceste observații arată paralelismul dintre fagocitoză și apărarea organismului.

Studiile comparative făcute asupra proceselor inflamatoare la diferite grupe de animale pe scară zoologică, expuse în „Patologia comparată a infecţiei" (Mecinikov, 1892), au pus bazele teoriei imunităţii celulare.

Experienţele lui Mecinikov, făcute pe animale lipsite de sistem vascular şi nervos, au dat posibilitatea cunoaşterii factorilor esenţiali care condiţionează procesul inflamator. S-a demonstrat că funcţia fagocitară la animalele superioare rămîne o proprietate a unor celule de origine mezenchimală, care-şi păstrează din funcţia digestivă primitivă rolul de înglobare şi digestie, în scop de apărare.

La om şi la animalele superioare, infecţiile bacteriene sînt deseori înlăturate prin fagocitoză şi digestia intracelulară a germenilor patogeni.

Inflamaţia reprezintă complexul reacţiilor biologice locale ale ţesuturilor şi ale aparatului său vascular, faţă de agentul nociv, care lezează ţesutul. Reacţiile biologice ale procesului inflamator, ca şi migrarea leucocitelor, urmată de fagocitoză, au fost obţinute în cursul evoluţiei filogenetice a animalelor, ca adaptări la diferite influenţe ale mediului extern, care acţionează asupra organismului. Modificările condiţiilor de mediu au extins sfera adaptărilor, cele inflamatoare devenind mai complexe. Manifestările procesului inflamator sînt totdeauna rezultatul combinării leziunilor tisulare împreună cu procesele reactive, produse sub acţiunea factorilor externi nocivi.

Inflamaţia la om şi la vertebratele superioare este dominată şi complicată de modificările vasculare: dilatarea şi creşterea permeabilităţii vasculare cu migrarea de leucocite şi de constituenţi plasmatici în ţesuturi.

Imediat după pătrunderea agenţilor nocivi (de exemplu, germeni patogeni) apare dilatarea vaselor mici, urmată de hiperemie (*rubor*) şi exsudarea plasmei cu proteinele plasmatice (*tumor*), cu hipertermie (*calor*) şi durerea regiunii inflamate (*dolor*). Accelerarea curentului sanguin şi limfatic iniţial poate favoriza transportul germenilor microbieni, aceştia putînd apărea în sînge.

Cohneim (1867) a observat pentru prima dată modificările vaselor, utilizînd mezenterul de broască. După distrugerea sistemului nervos central, la aproximativ 10 — 15 minute, se observă dilatarea vaselor, însoţită de creşterea presiunii cu accelerarea curentului sanguin. Ulterior, viteza curentului sanguin scade pînă la stază, iar plasma şi leucocitele traversează pereţii vaselor prin diapedeză, dînd naştere unui exsudat cu numeroase leucocite. Cohnheim considera alterarea pereţilor ca un fenomen esenţial. Observaţiile acestea au dat posibilitatea identificării celulelor din puroi cu leucocitele sîngelui.

La om şi la animalele superioare se observă, în condiţii fiziologice normale, emigrarea din vasele sanguine a leucocitelor. În stadiile iniţiale ale procesului inflamator se observă marginaţia leucocitelor (leucocitele se află în zona marginală a curentului circulator, aderînd de pereţii vaselor), după care urmează migrarea leucocitelor, care prin diapedeză ajung în ţesutul din jurul vasului. Pentru aceasta, leucocitele emit pseudopode care pătrund prin spaţiile intercelulare ale peretelui capilar, după care se scurge celula în întregime în afara capilarelor, apărînd astfel un număr de leucocite în exsudatul ţesutului inflamat. În cursul procesului inflamator, se produce o creştere a permeabilităţii vaselor, iar proteinele sanguine trec prin pereţi, la fel ca şi alte substanţe coloidale ca de pildă coloranții coloidali (albastru de tripan). Dintre proteinele sanguine trec în țesutul înconjurător, în primul rînd albuminele, apoi globulinele, inclusiv fibrinogenul. Pentru a se demonstra permeabilitatea mărită a vaselor față de coloizi se folosește, fie albastru de tripan marcat cu Br^{82}, radioactiv, fie o proteină marcată cu I^{131} care sînt inoculate intravenos la animale de experiență. În țesuturile normale nu se observă trecerea și acumularea acestor substanțe, însă în țesuturile cu vasele lezate se constată dispariția lor mai rapidă din sîngele animalului și o acumulare în zona inflamată. Proteinele străine, particulele de coloranți albastru de tripan, suspensii de grafit, toxine, germeni microbieni, introduse în focarul inflamator sînt reținute un timp mai îndelungat decît în țesuturile normale.

În zona inflamată se mai constată edemul țesutului, ca un rezultat al permeabilității capilarelor și al creșterii presiunii sanguine; datorită dilatării reflexe a capilarelor, zona este inundată de fibrinogen. Fibrinogenul plasmei exsudate coagulează, formînd o rețea de fibrină sau de trombi care obstruează capilarele limfatice și sanguine, constituind pereți în spațiile intertisulare și izolînd prin acest blocaj focarul inflamator de țesuturile învecinate. Pe fibrina coagulată se produce adsorbția mecanică a microorganismelor și o creștere a fagocitozei de suprafață. Acest proces constituie un factor important în limitarea diseminării microbilor și al generalizării infecției.

În infecțiile streptococice se constată mai puține tomboze ale vaselor limfatice decît la cele stafilococice (Menkin, 1956), avînd o mai mare tendință la diseminarea și generalizarea infecției.

Mecanismul chimic al inflamației. Cauza migrației leucocitare este legată de iritarea vaselor sanguine și a leucocitelor prin produsul bacterian și al țesutului lezat, precum și prin acționarea mecanică, chimică și termică, menită să determine răspunsul inflamator al vaselor sanguine. Mișcările leucocitelor se datoresc mai ales sensibilității lor față de excitanții chimici, care provoacă chimiotactismul (Leber, 1888). Acesta trebuie înțeles ca o reacție a organismului sau a celulei față de substanțele din jur, capabilă să determine direcția deplasării. Datorită mobilității leucocitelor și direcției determinate de excitanți, celulele fagocitare se pot apropia sau îndepărta de locul unde se găsesc microbii (chimiotactismul pozitiv și negativ). Microorganismele și produsele țesutului lezat sînt substanțe foarte active pentru atragerea leucocitelor. În mecanismul chimiotactismului, cea mai mare însemnătate o are probabil acțiunea excitantului chimic asupra tensiunii superficiale a leucocitelor.

Substanțele chimiotactice, în primul rînd peptidele care se formează la locul infecției difuzează, lezînd pereții vaselor, leucocitele din capilare deplasîndu-se spre locul țesutului lezat, care emite excitanți chimici. Mișcarea leucocitelor continuă pînă la înglobarea germenului microbian sau a particulei, după care încetează. Mișcarea leucocitelor, atribuită altădată numai modificării tensiunii superficiale, nu ne poate explica, de exemplu, fagocitarea particulelor chimic inerte (cărbune, granule de siliciu etc.). Forțele fizice nu sînt singurii factori, care intervin în creșterea consumului de oxigen ceea ce demonstrează un fenomen mult mai complex.

În unele cazuri migrarea de leucocite spre zona infectată este nulă, germenul exercitînd un chimiotactism negativ, de exemplu în cazul inoculării de pneumococi la şoarece (Cistovici, 1899); acest germen inoculat însă la cîine provoacă un chimiotactism intens pozitiv.

În primele stadii ale inflamaţiei, exsudatul este alcalin. În această perioadă predomină leucocitele polimorfo-nucleare (granulocitele), cu viaţă scurtă şi care nu se multiplică în ţesutul inflamat. Urmează apoi scăderea de pH, datorită descompunerii glucidelor şi a acumulării acidului lactic, schimbări însoţite de o creştere predominantă a macrofagelor, celule cu viaţă lungă, care se multiplică *in situ*.

În stadiile finale ale procesului inflamator, eozinofilele pot avea un rol în detoxificarea de proteine străine sau degradate şi a produşilor de dezintegrare.

Din exsudat s-au izolat:

1. leucotaxina — o polipeptidă care măreşte permeabilitatea capilarelor sanguine şi exercită un chimiotactism pozitiv, care provoacă leucocitoza;

2. un polipeptid relativ simplu, probabil o pseudoglobulină, termolabil, care stimulează măduva oaselor, provocînd eliberarea de leucocite (factorul promovator al leucocitozei);

3. în stadiile mai tardive ale inflamaţiei s-a izolat din exsudatele acide o proteină numită exsudina care măreşte permeabilitatea capilarelor sanguine;

4. din fracţiunea euglobulinică s-a izolat necrozina, o fracţiune citotoxică, care produce necroza ţesuturilor; *piroxina*, producătoare de febră şi *factorul leucopenic*, care provoacă reţinerea leucocitelor în pereţii alveolelor pulmonare, în ficat şi probabil în splină (Menkin).

Unii autori neagă specificitatea de acţiune a leucotaxinei, exsudinei susţinînd că efectele sus-menţionate pot fi provocate şi de alte substanţe de natură proteică, nespecifică. Polipeptidele variate pot reproduce fenomenele exsudative ale inflamaţiei; se presupune că aceste polipeptide se formează ca urmare a acţionării unor proteaze din ser sau celule, asupra proteinelor sîngelui ori ţesutului. Bacteriile care conţin proteine se pare că formează polipeptide, care acţionează asupra ţesuturilor, provocînd inflamaţiile.

Alte teorii arată că, în procesul inflamator acut bacteriile şi particulele străine se fixează şi se acumulează prin adsorbţia lor de către proteine fie prin precipitare, fie prin acţiunea altor factori fizico-chimici.

Factori deosebit de importanţi, care participă la acţiunea de fixare a microbilor în zona inflamată, sînt fagocitoza şi anticorpii. Fagocitele distrug microbii prin acţiunea de fagocitoză şi împiedică răspîndirea lor. Prin creşterea lichidului exsudatului, a numărului de fagocite şi prin îmbogăţirea în anticorpi normali, imuni, alexină, β-lizină etc. se dezvoltă capacitatea de apărare a organismului.

Reacţiile de mai sus sînt mult mai accentuate la animalele imune, la care se observă o creştere a numărului de microfage, ca rezultat al hiperplaziei sistemului reticulo-endotelial. Bacteriile injectate în curentul sanguin sînt rapid îndepărtate din curentul sanguin la animalele imune, datorită macrofagelor fixate în ficat, splină etc.

Fagocitoza

Este una din cele mai importante reacţii biologice în inflamaţie şi Mecinikov a fost acela care a dat interpretarea justă, fundamentată experimental ştiinţific, considerînd-o ca mecanismul de bază în apărarea organismului faţă de infecţie.

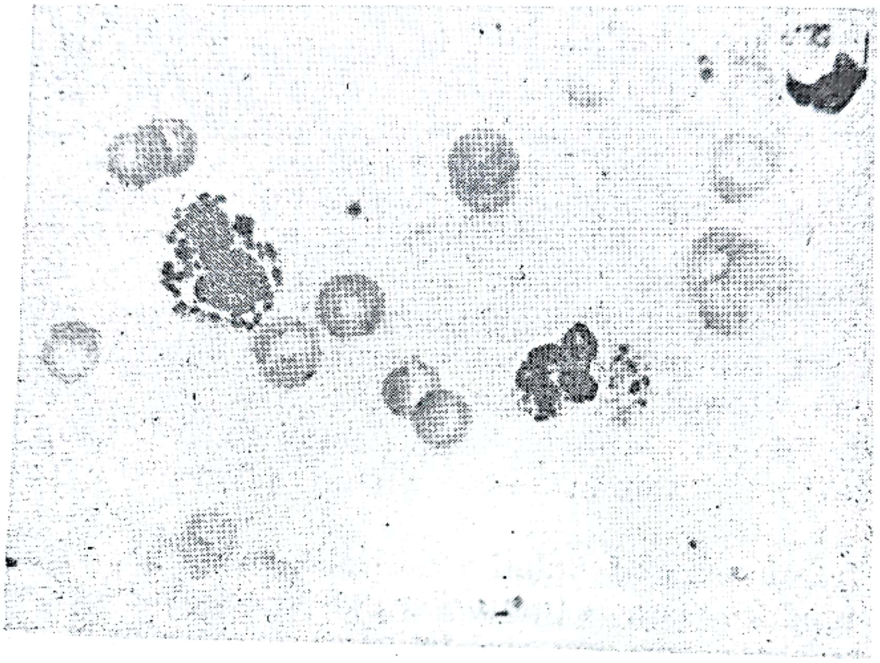


Fig. 73. — Pneumococi fagocitaţi de polimorfonucleare neutrofile (sînge periferic de om, coloraţie May-Grünwald-Giemsa, × 900).

Mecanismul fagocitozei. În cursul procesului de fagocitoză a germenilor microbieni sau de încorporare a diferitelor particule, se constată cel puţin trei faze: 1) faza de pregătire a suprafeţei germenului sau a particulei, făcîndu-l să adere mai uşor la suprafaţa celulei fagocitare (faza de opsonizare); 2) faza de adeziune a microbului sau a particulei de celula fagocitară şi 3) faza de înglobare şi digestie intracelulară.

S-a observat că, dacă leucocitul aderă de suprafaţa germenului microbian, fagocitoza va avea loc, în caz contrar fagocitoza va lipsi, aşa cum se întîmplă în cazul microbilor virulenţi. Astfel, streptococii virulenţi şi pneumococii de tip serologic III sînt puţin sau de loc fagocitaţi. Prezenţa capsulei la microbii sus-citaţi împiedică fagocitaza. S-a observat că, dacă se inoculează *B. anthracis* capsulat la un cobai, fagocitaza nu are loc şi animalul va muri; în schimb, dacă se inoculează bacili necapsulaţi, aceştia vor fi fagocitaţi şi animalul va supravieţui.

Leucocitele au capacitatea de a îngloba şi detoxifica substanţe toxice. Pentru a demonstra acest fapt, Besredka (1905) a introdus în cavitatea peritoneală a animalelor o suspensie de săruri arsenicale puţin solubile şi a observat că particulele de arsenic erau fagocitate de leucocite şi animalul rămînea în viaţă. Dacă aceeaşi cantitate de sare de arsenic era introdusă în cavitatea peritoneală într-un sac de colodiu, care împiedică fagocitoza particulelor, animalul murea cu simptome de otrăvire.

Fagocitoza se realizează la o temperatură optimă de 37° şi în prezenţa electroliţilor.

În terapia cu antibiotice, fagocitoza este un auxiliar valoros, aceste substanţe mărind valoarea fagocitozei.

Mişcarea şi înglobarea de către leucocite a microbilor pot fi urmărite prin diferite metode.

Pe o lamă de microscop se aşază o picătură dintr-o suspensie de stafilococ care se lasă să se usuce, iar pe o lamelă se pune o picătură de sînge obţinută prin înţeparea degetului. Se aşază apoi lamela pe lamă în aşa fel, ca să se formeze un strat subţire de sînge între lamă şi lamelă. Lamela se lipeşte pe margini — pentru a împiedica evaporarea sîngelui. Se observă la microscop, cu platină încălzită la 37°, mişcările amiboidale ale polimorfonuclearelor, în direcţia stafilococilor, pe care-i înglobează.

O altă metodă este aceea a observării la microscop a chimiotactismului şi a fagocitozei, în culturi de ţesuturi.

Mecinikov, împreună cu Bordet (1895), au observat că fagocitoza este mai crescută în serul imun, decît în cel normal. Savcenko (1901), Wright şi Douglas (1903), Neufeld (1905) constată prezenţa în umori a unui factor care activează fagocitoza, numit de către Wright opsonină (*opsono* = pregătesc mîncare) sau tropine de către Neufeld.

Experienţele de imunizare făcute pe *Sipunculide*, de către I. Cantacuzino, confirmă creşterea puterii opsonizante la animalele imunizate.

Wright şi Douglas au făcut o suspensie dintr-un amestec de bacterii şi leucocite în ser, pe care l-au păstrat la 37°, determinînd în acest fel intensitatea fagocitozei, prin evaluarea numărului de bacterii înglobate de fiecare leucocit. În acest fel au demonstrat prezenţa în sînge a unui factor stimulator al fagocitozei, care acţionează asupra microbului sau a particulei de înglobat. Aceste opsonine, care sînt de natura anticorpilor, prepară germenii microbieni sau particulele inerte pentru fagocitoză, provocînd anumite modificări fizico-chimice la suprafaţa lor, făcîndu-i mai uşor fagocitabili. Microbii trataţi cu opsonine manifestă o marcată tendinţă de aderare faţă de celulele endoteliului capilar. Pneumococii spălaţi cu ser fiziologic de urmele de ser sanguin nu vor fi opriţi în trecerea lor la nivelul ficatului, dar cei trataţi cu ser imun aderă de celulele endoteliului capilar şi nu se mai găsesc la ieşirea sîngelui din ficat. Experienţe similare au fost făcute cu *B. anthracis* de către Combiescu.

Opsoninele serului normal se distrug prin încălzire la 60°, prin acţiunea luminii şi prin păstrare.

Sînt observaţii care arată că activitatea opsoninei serului normal depinde de 2 componente, una termolabilă, identică probabil cu alexina (cu fracţiunile combinate C'_1, C'_2 şi C'_4) care activează cea de a doua componentă rezistentă la încălzire la 60° şi care este echivalentă cu anticorpul normal. Opsoninele normale şi cele specifice sensibilizează germenii microbieni pentru fagocitoză după un mecanism asemănător cu cel al bacteriolizei. În aceste reacţii se observă o condiţionare a factorilor celulari și umorali, anticorpii modificînd rezistența față de fagocitoză și față de acțiunea alexinei.

Recent, teoria fagocitară a fost criticată de Dubos, care consideră că, în jurul focarului inflamator, se formează un mediu nefavorabil dezvoltării microorganismelor, datorită peptidelor bazice, alexinei, aglomerării leucocitelor, produselor de dezagregare, de necroză, a țesuturilor, fibrinei, bioxidului de carbon etc. Această teorie nu contrazice însă teoria fagocitară a lui I. I. Mecinikov, ci o completează, ca pe o teorie universal acceptată.

Metode pentru studiul fagocitozei. Leucocitele necesare se obțin prin inocularea a 200—300 ml bulion sau soluție salină în cavitatea peritoneală a iepurelui, iar 3—4 ore mai tîrziu se recoltează exsudatul peritoneal prin puncționare și se centrifughează. Pe fundul eprubetei de centrifugă se depune un mare număr de leucocite, care se suspendă în ser sau în plasmă, adăugîndu-se și germeni microbieni sau particulele supuse fagocitozei. Amestecul din eprubete se păstrează la termostat, făcîndu-se la anumite intervale frotiuri colorate sau observîndu-se între lamă și lamelă mersul fagocitozei, cu ajutorul unui microscop cu masa încălzită la 37°. Se observă mișcarea, aderența, înglobarea și transformările morfologice ca urmare a digestiei intracelulare.

Digestia intracelulară. Fagocitaza în general este urmată de moartea și digestia intracelulară a germenilor microbieni. Modificările suferite în fagocite sînt în funcție de natura germenului microbian și a speciei animale de la care provin leucocitele. Bacteriile pot fi digerate de enzime numai dacă sînt omorîte. În general, speciile microbiene sînt ușor distruse și digerate de fagocite. Alte specii, mai puține la număr, sînt rezistente la digestia intracelulară; de exemplu, *M. tuberculosis*, gonococul. Macrofagele persoanelor receptive față de tuberculoză sînt incapabile de a distruge germenul — nu posedă lizozim, leucine și nici acizi grași cu lanțuri lungi — mai mult, germenii se pot multiplica, contribuind astfel la diseminare, după moartea macrofagelor. *M. leprae* poate trăi și se poate multiplica în interiorul macrofagului, acesta constituind gazda naturală. În cazurile de mai sus, germenii microbieni sînt apărați față de acțiunea substanțelor bactericide și a medicamentelor conținute în umori.

Cauzele morții microbilor pot fi determinate într-o anumită măsură de enzime și mai ales de leucine, fagocitine și lizozim. Microbii omorîți sînt digerați, digestia putînd fi urmărită pe frotiurile colorate ce se fac la anumite intervale dintr-un tub ce conține un amestec de leucocite cu bacterii în ser sanguin, păstrat la termostat la 37°. În primele probe, bacteriile apar bine colorate în citoplasma fagocitului, ca apoi să apară incluse în vacuole digestive, ce conțin enzime, cu pH acid, iar colorația microbilor să fie din ce în ce mai slabă : la început sînt mai mari, umflați, apoi fragmentați, granulari, pentru ca la urmă să dispară cu desăvîrșire. Observații în acest sens au fost făcute cu *Vibrio mecinikovi*, *B. anthracis* (Cantacuzino și Mesnil, 1896), *Actinom. mallei* (Cantacuzino-Riegler, 1907).

Digestia germenilor microbieni se face intracelular, cu ajutorul enzimelor pe care le posedă : proteaze, conținute mai ales în leucocite polimorfonucleare, active în interiorul leucocitului viu, apoi tripsina și catepsina, enzime autolitice, lipaze, enzime ale hidraţilor de carbon (maltază, amilază), catalaza, oxidaza, peroxidaza. Plasma se îmbogăţeşte în fermenţi proteolitici (tripsina) probabil prin eliminarea lor din leucocite. Faptul că nu digeră ţesuturile vii, se datoreşte unor substanţe inhibante ale organismului. În cursul digestiei intracelulare, metabolismul se modifică, consumul de oxigen fiind mult crescut.

O funcţie importantă a enzimelor este digerarea fibrinei şi a resturilor tisulare din zona inflamată.

Evoluţia conflictului între macro- şi microorganism, datorită diversităţii speciilor microbiene şi reactivităţii naturale diferite, prezintă o mare varietate. Uneori, înmulţirea microbului este atît de rapidă încît fagocitoza este total absentă, germenii răspîndindu-se foarte repede. Altcori, datorită rezistenţei celulare, ei sînt opriţi la nivelul porţii de pătrundere sau la nivelul ganglionilor.

Inocularea la cobai de germeni virulenţi pe cale subcutanată este mai periculoasă decît pe calea intraperitoneală. Exsudatul subcutanat fiind mai puţin bactericid, afluxul leucocitar se efectuează mai încet, germenii au timp de adaptare, iar unii îşi pot dezvolta capsulă.

În cazul cînd scade sau este oprită activitatea fagocitară a celulelor, se constată o scădere marcată a rezistenţei organismului. La copii după naştere, leucocitele sînt mai puţin active în ce priveşte fagocitoza decît la adult. O înmulţire a leucocitelor (leucocitoză) sau o aglomerare la locul infecţiei cresc rezistenţa organismului. Creşterea numărului de leucocite poate fi produsă şi de agenţi nespecifici ; de pildă bulionul inoculat la cobai în cavitatea peritoneală (Pfeiffer-Isaeff, 1894) provoacă o aglomerare mare de leucocite şi animalul devine imun faţă de inocularea ulterioară a vibrionului holeric, deoarece leucocitele mobilizate înglobează vibrionii şi infecţia nu mai are loc. La cobaii normali se găsesc leucocite în număr redus şi nu au capacitatea de a îngloba toţi vibrionii introduşi, iar afluxul, făcîndu-se mai încet, infecţia nu poate fi stăvilită.

La iepure s-a observat de asemenea că, prin inocularea succesivă pe cale intradermică de bulion, urmată de o doză mortală de streptococ, la interval de 24 de ore, animalul este protejat, rămînînd în viaţă. Dacă se inoculează simultan, animalul moare, nefiind protejat de leucocite, care nu au avut timpul necesar pentru a fi mobilizate. Procesul inflamator cu mobilizarea elementelor celulare şi umorale la locul primei inoculări localizează procesul infecţios, oprind diseminarea microbilor şi apariţia infecţiei (Rivers şi Tillet, 1925).

Există un paralelism strîns între gradul fagocitozei şi rezistenţa organismului.

Celulele fagocitare ale organismului. Numeroase tipuri de celule din organism au capacitatea să înglobeze, fie microbi, fie particule inerte. Ele au şi capacitatea de a produce anticorpi. Tulburarea capacităţii de diferenţiere a celulelor reticulare duce la lipsa apariţiei celulelor plasmatice, limfocite, polimorfonucleare, neutrofile, eozinofile, cu deficienţe grave în apariţia rezistenţei naturale şi dobîndite.

La om, celulele fagocitare sînt de două feluri : leucocitele polimorfonucleare neutrofile şi fagocitele mari, mononucleare.

Mecinikov a grupat celulele fagocitare în două grupe mari :

1. Microfagele sau leucocitele cu nucleu polimorf, din sîngele circulant.

2. Macrofagele sau celulele mononucleare mari. Acestea sînt fie elementele libere, monocitele din sîngele circulant, fie celulele tisulare fixe, histiocitele, grupate de către Aschoff în sistemul reticulo-endotelial.

În urma cercetărilor făcute s-a văzut că sînt foarte numeroase și variate celulele cu capacitate de fagocitoză.

Inoculîndu-se la iepure, pe cale intravenoasă, carmin litinat, albastru de tripan etc. se constată că numeroase celule cu răspîndire caracteristică în organism au capacitatea de acumulare a coloranților electronegativi. Aceste celule au fost numite la început cromofile (Ribbert, 1904; Golmann, 1909).

De asemenea, dacă se inoculează la iepure pe cale intravenoasă germeni microbieni nepatogeni, se constată, după cîteva ore, dispariția lor din sînge. Această dispariție este datorită fagocitării și distrugerii lor de către celulele endoteliale ale capilarelor sinusoide din splină, ficat (celule Kupffer), măduva oaselor, ganglioni limfatici (Vîsokovici).

Mecinikov grupează în sistemul macrofagic, atît celulele din sistemul reticulo-endotelial Aschoff, cît și macrofagele țesuturilor inflamate, și poliblastele intermediare. Recent, Taliaferro (1949) a reunit celulele sistemului reticulo-endotelial, sistemul macrofagic, împreună cu monocitele, limfocitele și celulele plasmatice într-un sistem limfoido-macrofagic.

De asemenea, în ultima perioadă de timp au fost încadrate în componența țesutului reticulo-endotelial și elementele microgliale (Del Rio Hortega) ale creierului, constituind, alături de celulele reticulo-endoteliale și de histiocite, al IV-lea tip de element constitutiv al acestui complex tisular.

Leucocitele neutrofile au ca funcție importantă fagocitoza bacteriană. Sînt eficiente față de cele mai multe specii microbiene, afară de *M. tuberculosis*, care este fagocitat de monocite. Polimorfonuclearele neutrofile, datorită prezenței lor în sînge în număr mare, migrării și mobilizării lor rapide în zona inflamației, ca urmare a chimiotactismului lor, constituie prima linie a apărării celulare.

Aceste leucocite mai posedă și capacitatea de a digera fibrină și resturile tisulare din regiunea inflamată.

Leucocitele eozinofile au capacitate fagocitară mai redusă; apar în unele inflamații în stadiile mai tîrzii. Leucocitele bazofile sînt mai puțin cunoscute în ce privește rolul lor în reacțiile imunologice. S-a observat că nu cresc numericește în cursul infecțiilor acute.

Fagocitele mononucleare sînt larg răspîndite. În sînge sînt mobile (monocite), în țesuturi sînt sesile (macrofagele, histiocitele, poliblastele, celule ale sistemului reticulo-endotelial din ficat, splină, ganglioni limfatici, măduvă a oaselor, plămîni, piele). Macrofagele sesile manifestă o capacitate de fagocitare intensă, înglobînd nu numai germenii microbieni, ci și celule tisulare lezate, leucocite moarte etc. Se multiplică activ în țesuturi și, uneori, pot deveni mobile.

În infecțiile acute, fagocitele mononucleare apar tîrziu în zona inflamată, datorită probabil numărului lor mai redus și chimiotactismului lor. Ele reprezintă a doua linie celulară de apărare, în infecțiile cronice îndeplinind rolul principal în rezistența celulară.

Aceste elemente provin din histiocite și se transformă și se multiplică activ în celule epitelioide. Alteori, celulele epitelioide pot da naștere la celule plasmatice, mari, gigante, multinucleate, numite celule gigante Langhans.

De altfel dezvoltarea de celule gigante macrofage, sub formă de mase plasmodiale cu mai mulţi nuclei, a fost descrisă de Cantacuzino în experienţele făcute prin introducerea în cavitatea peritoneală de corpi străini care au determinat apariţia acestor tipuri celulare.

Limfocitele apar în stadii mai tîrzii ale inflamaţiei şi ajung acolo migrînd din vasele sanguine sau din ţesutul limfoid. După cei mai mulţi cercetători nu prezintă chimiotactism şi nu au funcţie fagocitară. Au rol în producerea de anticorpi.

Celulele plasmatice sînt asemănătoare limfocitelor şi se găsesc cu predominanţă în ţesuturile inflamate cronic. Au în primul rînd rol în elaborarea anticorpilor. În ţesuturile bogate în celule plasmatice se constată prezenţa unui conţinut crescut de anticorpi.

Funcţia de barieră a celulelor sistemului reticulo-endotelial, al ganglionilor limfatici, la care se adaugă funcţia fagocitară a leucocitelor, creşte odată cu imunizarea organismului.

Pinocitoza

Pinocitoza (*pinos* = a bea, *citos* = celulă), reprezintă fenomenul de ingerare discontinuă a soluţiilor, pe care îl prezintă unele tipuri de fiinţe unicelulare ca amoebele, cît şi unele celule ale plantelor sau animalelor (leucocite, eritroblaşti, celule splenice, hepatice, celule Kupffer, alveolare etc.).

În procesul de pinocitoză, celulele prezintă modificări active ale membranei după contactul cu un factor inductor, urmată de înglobarea lichidului fie direct în vacuole, fie prin intermediul unui canalicul, ce rezultă din invaginarea membranei.

Caracteristice pentru procesul de pinocitoză sînt deci modificările active ale membranei, invaginările, care pot lua aspectul unui canalicul şi vacuolele intracitoplasmatice

Între factorii inductori ai pinocitozei se găsesc diferite substanţe solvate, de exemplu : ionii metalici, K, Na etc., antigenele solubile, proteinele, endotoxinele, complexul antigen-anticorp, cu rol deosebit în procesele imunologice.

Diferite cercetări au demonstrat că antigenele solubile, complexele antigen-anticorp, antigenele fixate de anticorpii de suprafaţă, sînt captate de imunocite prin pinocitoză.

În procesul de pinocitoză, faptul esenţial rămîne inductorul pinocităţii, reprezentat de soluţii în care substanţa solvată are principalul rol în declanşarea acestui fenomen.

Areactivitatea celulară

Un fenomen important al imunităţii naturale este receptivitatea diferită a speciilor animale, faţă de un acelaşi germen patogen sau toxină microbiană. Reactivitatea celulară diferită faţă de microb şi produsele lui este o parte a mecanismului biologic de apărare a organismului. Un germen microbian poate fi patogen pentru o specie, dar nu pentru o altă specie, deoarece ţesuturile şi celulele sînt indiferente sau rezistente faţă de acţiunea

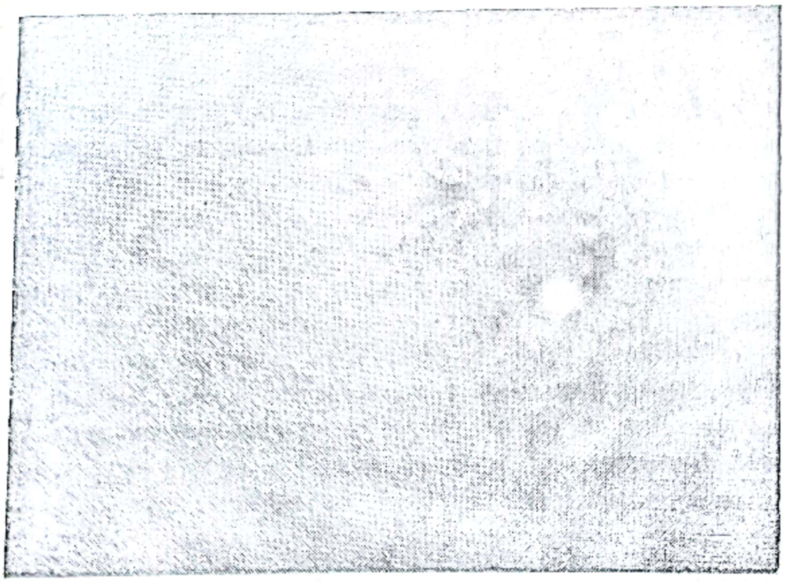
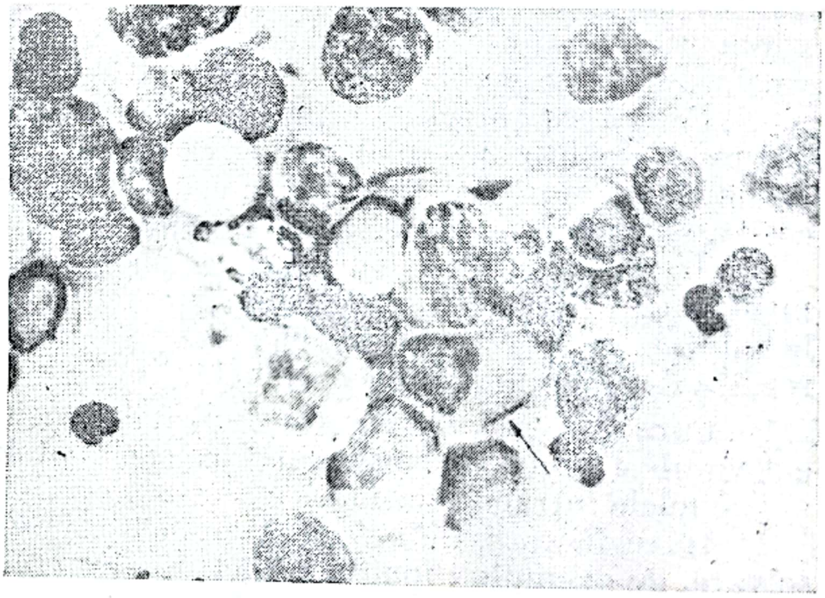


Fig. 74. — Leucocite din exsudat peritoneal de cobai, prezentînd fenomenul de pinocitoză al endotoxinei „O” de *S. thyphimurium.* Microscopie cu fluorescenţă (2 450 ×) (Colecţia Prof. I. Mesrobeanu — C. Bona).

Fig. 75. — Amprentă din splină de şoarece infectat cu *B. pertussis.* Grup de celule plasmocitare (→) în diferite stadii de diferenţiere. Coloraţie May-Grünwald-Giemsa. Microfotografie (1 250 ×).



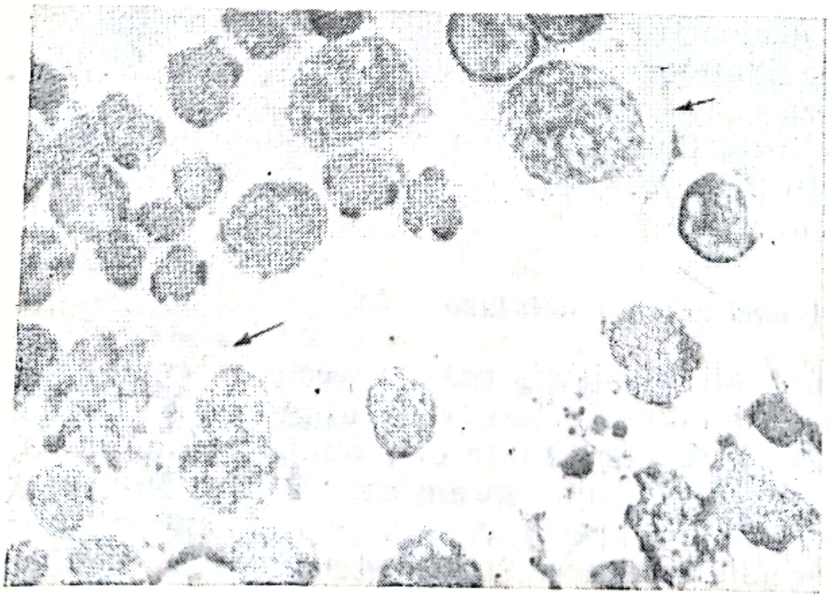


Fig. 76. — Amprentă din splină de şoarece infectat cu *B. pertussis.* Frecvente celule reticulare nediferenţiate (→); celulă reticulară în macrofagie; eritroblaşti policromatofili şi ortocromatici, limfocite. Microfotografie (1 250 ×). Coloraţie May-Grünwald-Giemsa.

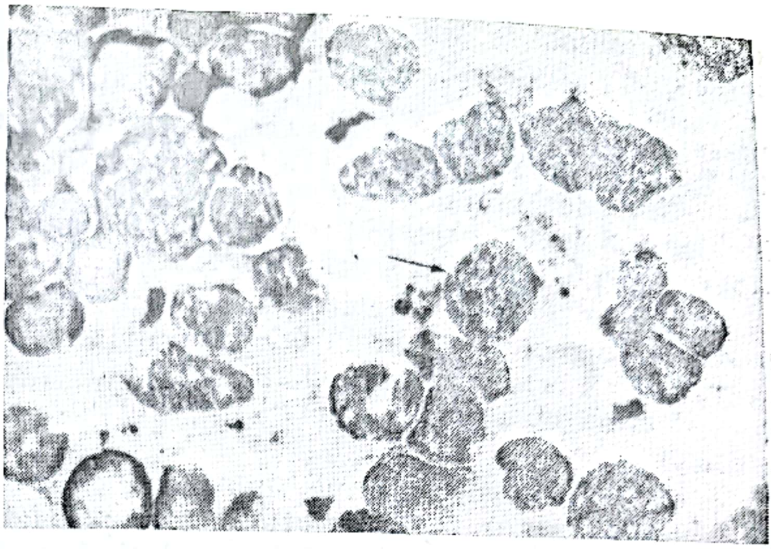


Fig. 77.—Amprentă din splină de şoarece infectat cu *B. pertussis.* În centru o celulă reticulară macrofagică (→), în rest frecvente limfocite, prolimfocite şi celule reticulare nediferenţiate. Coloraţia May-Grünwald-Giemsa. Microfotografie (1 250 ×).

acestuia. În aceste cazuri lipseşte sensibilitatea primară a celulelor organismului faţă de germeni sau faţă de toxină. În cazul acestor specii animale, germenii pătrunşi în organism se pot multiplica o perioadă scurtă de timp, după care se distrug şi dispar, pe cînd la cele receptive (sensibile) se înmulţesc în mod intensiv şi un timp îndelungat.

În unele cazuri, celulele sensibile faţă de unii microbi sau toxine pot fi apărate faţă de acţiunea acestora, prin combinarea agenţilor nocivi cu celule indiferente ale corpului. Toxina tetanică introdusă la cîine, pisică, nu provoacă simptome de boală, datorită fixării acesteia pe ţesuturile insensibile sau cu sensibilitate redusă, sau în urma distrugerii ei înainte de a se fixa pe sistemul nervos central.

Lipsa sensibilităţii primare a fost demonstrată şi de Mecinikov, prin inocularea unei doze mari de toxină tetanică la broască ţesoasă, constatîndu-se că după 4 luni există încă o cantitate de toxină suficientă pentru a omorî un şoarece alb. Toxina a rămas liberă, nefiind neutralizată şi nici fixată, elementele celulare fiind indiferente faţă de ea.

Factorii determinanţi ai variaţiei rezistenţei după specie sînt cunoscuţi, dar în genere sînt necunoscuţi. Între cei cunoscuţi amintim temperatura corpului, structura anatomică, compoziţia chimică, metabolismul, tensiunea oxigenului. Pasteur demonstrează scăderea imunităţii naturale faţă de antrax paralel cu scăderea temperaturii; astfel, dacă se introduc picioarele unei găini în apă rece aceasta se îmbolnăveşte de antrax. Tensiunea oxigenului din ţesuturi influenţează multiplicarea germenilor — de exemplu anaerobii se dezvoltă într-un ţesut devitalizat, lezat, fără acces la oxigen, iar *M. tuberculosis*, din contră, are nevoie de o tensiune mai înaltă de oxigen în ţesuturi.

Modificarea reactivităţii

Reactivitatea organismului se modifică în general în cursul vieţii, rezistenţa faţă de acţiunea germenilor patogeni creşte o dată cu vîrsta, dar există şi numeroase excepţii.

Embrionii de găină sînt foarte sensibili faţă de microbi şi permit înmulţirea lor intensă, de exemplu, rickettsiile, S. *typhi* etc. De asemenea copiii şi animalele tinere sînt în general mai sensibile. Mecanismul imunologic este slab dezvoltat la naştere.

În cursul pubertăţii se dezvoltă o imunitate mai variată, iar în cursul maturităţii sexuale rezistenţa creşte faţă de infecţii. Modificările receptivităţii au la bază transformări în fiziologia organismului.

În evoluţia multor boli se constată diferenţe, după sex, în ce priveşte incidenţa lor, de exemplu: pneumonia, meningita epidemică sînt mai frecvente la bărbaţi, iar scarlatina, febra tifoidă apar mai frecvent la femei.

Rasele animale prezintă deosebiri ale rezistenţei faţă de acelaşi microb patogen, de exemplu oile africane sînt mai puţin sensibile faţă de antrax, decît cele europene, şoarecii albi sînt mai receptivi faţă de pneumococ, streptococ, decît cei cenuşii, şobolanii albi sînt rezistenţi faţă de antrax etc.

În cazul raselor umane sînt teorii care susţin existenţa unei stări de imunitate naturală, în funcţie de rasă; astfel, negrii ar fi mai rezistenţi faţă de malarie, rasa galbenă la scarlatină, malaezii ar fi foarte sensibili la pneumococ, negrii la tuberculoză etc. În studiul şi interpretarea diferenţelor de imunitate naturală existente la rasele umane, trebuie avute însă în vedere deosebirile privind condiţiile economice, alimentaţia, de igienă, trecutul epidemiologic şi imunitatea dobîndită în cursul existenţei şi dezvoltării rasei. Un rol foarte important îl joacă factorii de natură socială.

Influenţa stării fizice, a oboselii, a regimului alimentar, a climatului

Imunitatea naturală este în strînsă legătură cu funcţionarea fiziologică normală şi starea generală bună a organismului. Rezistenţa naturală poate fi redusă prin oboseală. Această stare fizică influenţează echilibrul fiziologic, favorizînd creşterea receptivităţii faţă de germenii patogeni. De exemplu şobolanul alb normal este foarte rezistent faţă de antrax, obosit devine însă receptiv.

Deseori se constată o legătură între receptivitatea faţă de bolile infecţioase şi regimul alimentar deficitar. Inaniţia, lipsa de vitamine, deficitul în aminoacizi, sînt factori care influenţează morbiditatea şi mortalitatea. Un regim mai bogat în calciu, proteine şi vitamine determină la şoareci o rezistenţă mai mare faţă de tuberculoza provocată prin inocularea intravenoasă a *M. tuberculosis*. Lipsa de proteine duce la o scădere a rezistenţei, deoarece carenţa respectivă interferează cu funcţionarea normală a mecanismului de apărare celulară, reducîndu-se fagocitoza.

S-a constatat la om şi s-a demonstrat pe animale (şobolani) că un regim alimentar deficitar în vitamina A are ca rezultat o scădere a rezistenţei faţă de infecţie. Lipsa vitaminei A lezează prima barieră de apărare; ţesuturile lezate împiedică funcţionarea normală a mecanismelor de apărare, fie ale sistemului reticulo-endotelial, fie ale anticorpilor umorali.

De asemenea un regim carenţat în vitaminele complexului B (tiamina, riboflavina, piridoxina, acidul nicotinic, acidul pantotenic, biotina) şi în vitamina C provoacă apariţia unei receptivităţi mărite faţă de infecţie. Şoarecii menţinuţi la un regim sărac în tiamină şi riboflavină prezintă o rezistenţă scăzută faţă de infecţia cu pneumococ tip serologic I. La fel, lipsa de vitamină C în alimentaţia copiilor pare să crească incidenţa faţă de infecţia cu pneumococ.

Leucocitele cobailor cu scorbut sînt mai puţin active decît ale animalelor normale (Nungester şi Ames, 1952).

In vitro, s-a constatat o inhibiţie a creşterii bacilului difteric şi cocobacilului tusei convulsive, pneumococului, streptococului etc. prin adăugarea de mici cantităţi de vitamină C.

Toxina difterică, toxina *Cl. perfringens* şi toxina stafilococică sînt detoxificate prin adăugarea vitaminei C.

Rezistenţa organismului este influenţată de asemenea de condiţiile de climat şi de sezon. Temperaturile joase scad rezistenţa, de exemplu faţă de infecţiile respiratorii, care sînt crescute ca incidenţă în zona temperată, în timp ce la tropice sînt scăzute.

Variaţiile sezoniere au un rol în incidenţa crescută sau scăzută a unor boli infecţioase, de pildă meningita meningococică predomină iarna şi primăvara, holera în sezonul cald. Cobaiul prezintă rezistenţă crescută vara faţă de rickettsia murină.

În numeroase cazuri, influenţa climatului şi a sezonului se reduc la factori legaţi de aglomerarea populaţiei în spaţii mici care favorizează transmiterea, de apariţia sezonieră a insectei vectoare, de regimul alimentar schimbat etc.

Imunitatea dobîndită

Prof. N. Nestorescu, dr. C. C. Oprescu

Pe lîngă imunitatea „naturală" care, cum s-a arătat, constituie starea de nereceptivitate totală şi înnăscută a unui organism faţă de infecţie organismul poate dobîndi şi o stare de rezistenţă specifică faţă de unele infecţii, în cursul vieţii sale: aceasta este imunitatea „dobîndită" sau „cîştigată". Ea apare ca rezultat al conflictului pe care organismul îl duce la un moment dat împotriva unui agent infecţios, fie în mod *activ*, fie în mod *pasiv*.

Imunitatea dobîndită activ apare ca urmare, fie a unui *proces infecţios vindecat* (de exemplu, febra tifoidă), instalîndu-se, aşadar în mod natural, fie *artificial*, graţie metodelor zise de *vaccinare*.

Imunitatea dobîndită pasiv se poate căpăta congenital (de la mamă la făt), dar poate fi conferită şi artificial, prin transferul pasiv de umori (ser sanguin) provenite de la un organism imun, la organismul neimun.

Mecanismul prin care se instalează în organism imunitatea dobîndită este complex şi înţelegerea lui presupune cunoaşterea prealabilă a factorilor care formează substratul acestei imunităţi.

Imunitatea dobîndită activ, pe cale artificială, se bizuie pe starea de rezistenţă conferită în mod natural de o boală infecţioasă vindecată. Ea poate fi creată şi prin metodele pasteuriene de *vaccinare*, care constau esenţial din injectarea, la un organism neimun, a unei mici cantităţi de germeni vii şi atenuaţi, capabili să-i provoace o boală uşoară sau ocultă, urmată de instalarea unei stări refractare faţă de o eventuală reinfecţie cu acelaşi germen virulent. Ulterior, starea refractară a putut fi conferită şi prin injectarea de germeni omorîţi prin diverse procedee (căldură, agenţi fizici şi chimici etc.). În unele cazuri, conferirea acesteia s-a putut realiza şi prin inocularea unui germen virulent, diferit de cel care a provocat infectarea (de exemplu, inocularea de virus vaccinal pentru obţinerea protecţiei faţă de variolă etc.). În bolile al căror tablou morbid este determinat de acţiunea toxinelor microbiene (endo- şi exotoxine), protecţia se poate obţine şi prin injectarea unor doze subletale de toxină (difterică, tetanică, botulinică etc.) sau de anatoxină (imunitate antitoxică).

Imunitatea dobîndită pasiv la naștere este trecătoare, ea durînd atîta vreme cît în organismul imunizat mai persistă umorile căpătate de la organismul matern imun. Imunitatea dobîndită pasiv, prin transfer, se instalează instantaneu, chiar din momentul efectuării transferului (transfuzie), persistînt atîta vreme cît organismul receptor mai posedă din umorile „imune” provenite de la donator.

Unele infecții lasă după ele o imunitate solidă, care durează deseori tot restul vieții. Altele conferă o imunitate trecătoare, sau nu conferă nici o imunitate, lăsînd, după vindecare, organismul tot atît de receptiv ca înainte de îmbolnăvire.

Atît imunitatea dobîndită în mod activ prin vaccinare, cît și cea cîștigată pasiv prin transfer, au mai ales un caracter umoral, fiind datorite prezenței în organismul imunizat, a unor factori umorali specifici cunoscuți sub numele de *anticorpi*. Aceștia sînt substanțe care aparțin ca natură chimică globulinelor plasmatice și apar în ser și umori ca urmare a unei incitări provocate prin contactul organismului cu anumite substanțe capabile să determine elaborarea lor, cunoscute sub numele de antigene.

Anticorpii sînt deci substanțele umorale care apar în organism ca răspunsuri specifice la incitarea provocată de administrarea, în genere parenterală, a unor substanțe antigenice, cu care reacționează specific.

Antigenele sînt substanțe care, o dată introduse în organism provoacă sau stimulează elaborarea de anticorpi specifici, cu care reacționează specific.

Studiul acestor două categorii de substanțe și al fenomenelor, pe care interacțiunea dintre ele le determină, constituie capitolul cel mai important al imunologiei.

Antigenele

Antigenele posedă două caracteristici esențiale : provoacă formarea anticorpilor corespunzători (omologi) și se combină cu anticorpul a căror elaborare au provocat-o.

Antigenicitatea unei substanțe, adică capacitatea ei de a se comporta ca un antigen, este o proprietate care se regăsește cel mai ades la proteinele din constituția unor microorganisme (bacterii, virusuri) și a unor paraziți. Se cunosc însă și substanțe neproteice care manifestă proprietăți antigenice (de exemplu, glucozidul toxic din *Amanita phalloides* etc.).

S-a constatat că, pentru ca o substanță să fie antigenică, ea trebuie să aibă următoarele caracteristici :

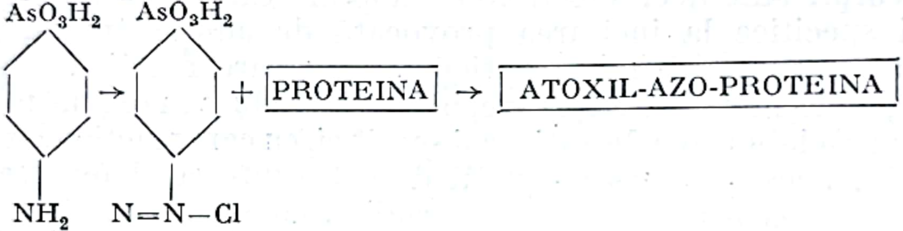
— să fie substanță străină de economia organismului căruia îi este administrată ;

— să posede un anumit grad de complexitate structurală ;

— să posede o anumită greutate moleculară.

Aceasta explică de ce antigenicitatea unei substanțe este cu atît mai pronunțată cu cît aceasta provine de la un organism mai îndepărtat taxonomic de cel receptor și pentru ce substanțele proteice cu moleculă relativ simplă (protaminele, gelatina) nu sînt antigenice, în vreme ce proteinele macromoleculare (de exemplu, hemocianinele) manifestă o antigenicitate foarte marcată.

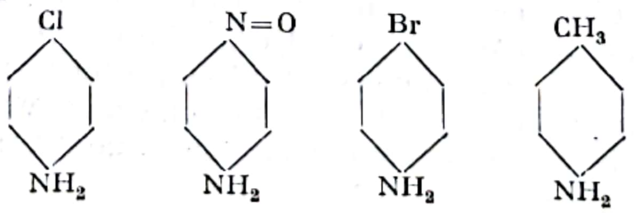
Cercetările au arătat că prezența în moleculă a unui radical aromatic este indispensabilă. Astfel, lipsa de antigenicitate a gelatinei se explică și prin faptul că molecula acestei substanțe este lipsită de aminoacizi aromatici (tirozină, fenilalanină). Se consideră că, în general, antigenicitatea unei substanțe presupune ca aceasta să aibă o greutate moleculară mai mare de 10 000. Unele substanțe cu greutate moleculară inferioară acestei cifre pot deveni antigenice, dacă, după injectarea lor în organism pe cale parenterală, au capacitatea de a se combina cu proteinele proprii ale acestuia. Antigenicitatea unei proteine poate fi afectată prin introducerea în moleculă a unor anumiți radicali (de exemplu, radicalul N = O); totodată, anumite grupări chimice simple pot determina apariția antigenicității. Astfel, atoxilul (sarea sodică a acidului arsanilic) este o substanță chimică simplă, neantigenică, care după diazotare, poate fi cuplat cu o proteină (de pildă, serumglobulină de cal). Substanța astfel obținută, dacă este injectată la animal sub formă de atoxil-azo-proteină, determină apariția, în serul acestuia, de anticorpi specifici îndreptați împotriva atît a azoproteinei, cît și a tuturor atoxil-azo-proteinelor, indiferent de originea zoologică a proteinei care intră în compoziția lor.



Atoxilul

Produsul diazotat al atoxilului

Astfel, atoxilul imprimă specificitatea lui proprie macromolecule de atoxil-azo-proteină, și servește ca punte de legătură între aceasta și molecula-anticorp cu care ea se unește. El saturează afinitățile moleculei de anticorp pentru antigen și comandă „specificitate" complexului antigenic din care face parte. Reacția nu este o precipitare vizibilă macroscopic, ci este o „reacție de inhibiție", datorită moleculei mici a atoxilului. Asemenea grupări chimice, cu funcții asemănătoare celei a atoxilului, sînt cunoscute sub numele de grupări determinante; ele diferă de haptene tocmai prin aceea că, deși se unesc cu anticorpii, nu dau loc la reacții de precipitare vizibile. Funcția de grupare determinantă este datorită radicalului acid pe care aceasta îl cuprinde; în cazul atoxilului: acidul arsenic (H_3AsO_4). De aici s-a dedus că specificitatea însăși a antigenelor este în funcție de *radicalii acizi* și că, probabil, însăși antigenicitatea proteinelor se datorește aminoacizilor pe care-i conțin în moleculă. În grupările determinante în care nu există radicali acizi, antigenicitatea este condiționată de *poziția substituenților* în nucleul aromatic: de pildă, anticorpul specific față de p-cloranilină reacționează în același mod și față de p-nitrozoanilină, p-bromoanilină și p-toluidină:



Configurația spațială a moleculei grupării determinante joacă de asemenea un rol important : izomerii ei *dextro* și *levogiri* posedă specificitate antigenică diferită, ca și formele *cis* și *trans*, grupări care se deosebesc prin poziția lor față de atomul de carbon, ca de exemplu :

$$H-C-OH \quad \text{și} \quad OH-C-H$$

Proteinele racemizate, prin tratare cu alcali, pot pierde antigenicitatea, datorită alterării structurilor specifice pentru funcția antigenică, ceea ce arată importanța care revine *activității optice* a unei substanțe în ce privește proprietățile antigenice.

Rezultă așadar că antigenicitatea unei molecule proteice este determinată atît de aminoacizii care intră în structura primară a moleculei sale, cît și de configurația spațială a grupărilor ei polare care constituie „structura secundară'' a moleculei.

Dar nu numai macromoleculele proteice în stare coloidală pot fi antigene, ci, în anumite condiții, și moleculele organice simple (de pildă hexozele, clorura de picril, etanolul, florizina etc.), dacă sînt injectate în organism de repetate ori și în doze masive. În asemenea cazuri, în ser nu apar anticorpi decelabili macroscopic (precipitare), moleculele fiind prea mici pentru a forma precipitate, însă prezența lor este atestată de creșterea marcată a viscozității serului în mod specific (Loiseleur, Levy).

Un antigen adevărat posedă întotdeauna capacitatea de a se combina specific cu anticorpul corespunzător, a cărui apariție a determinat-o. Sînt însă și substanțe care, deși nu posedă capacitatea de a incita elaborarea de anticorpi serici, pot totuși reacționa specific cu aceștia *in vitro*. Asemenea antigene incomplete au primit numele de *haptene*. Ele sînt de fapt fragmente de antigene veritabile, cărora le imprimă însă caracterul de specificitate. Astfel, dacă o haptenă este cuplată cu un substrat proteic, ea capătă calitățile unui antigen adevărat. Cuplarea artificială poate fi realizată și prin folosirea de suporturi neantigenice prin ele însele (particule de colodiu, de hidroxid de aluminiu etc.), care, adsorbind haptenele pe suprafața lor, le conferă un volum suficient de mare pentru a le transforma în antigene. Dat fiind că specificitatea poate fi conferită chiar și numai printr-un fragment de antigen, rezultă că un antigen poate cuprinde mai multe haptene diferite, fiecare dintre ele cu specificitatea sa proprie. Pe de altă parte, două antigene diferite pot poseda o haptenă comună, ceea ce explică de ce serurile imune obținute cu antigene diferite, pot da reacții imunologice încrucișate. Numărul antigenelor din care s-au putut izola fracțiuni haptenice este relativ mare și rolul imunologic al acestor fracțiuni poate fi foarte important, de pildă haptena polizaharidă a antigenului glucido-lipido-polipeptidic al salmonelelor etc.

În mod experimental, haptenele se pot cupla cu moleculele de proteine prin diferite procedee și în special prin metoda lui Landsteiner : se prepară un azoconjugat proteic (azoproteină), plecîndu-se de la o amină aromatică diazotată, care este fie cuplată cu proteina prin intermediul histidinei sau tirozinei din molecula proteică, fie substituită prin diferite grupări chimice de cercetat. În acest mod s-a putut conferi de pildă antigenicitate gelatinei, introducîndu-i în moleculă grupări aromatice : acid arsanilic (Hooker). Într-o amină aromatică, antigenicitatea este în funcție de prezența sau absența în moleculă a unei grupări acide (radical carboxilic, radical sulfonic), ca şi de poziţia acesteia în raport cu gruparea aminică (meta sau para), grupările metilice sau atomii de clor, nepărînd să aibă un rol important. În lanţurile alifatice, specificitatea este imprimată de acizii inferiori (oxalic sau succinic), un carbon în plus sau în minus putînd modifica antigenicitatea moleculei. Pe de altă parte, s-au putut obţine şi reacţii încrucişate între acizii superiori, observîndu-se că, cu cît lanţul este mai lung, cu atît scade importanţa atomilor de carbon suplimentar. În ce priveşte aminoacizii, reacţiile încrucişate pot fi obţinute numai între acelea cu molecule înrudite (de exemplu, glicină, alanină, valină, leucină, acid aspartic-acid glutamic), rolul important revenind acidului terminal. Cercetările în acest domeniu au mers atît de departe, încît au permis lui Goebel ca, după identificarea unităţii structurale a polizaharidului capsular specific al pneumococului de tipul al III-lea (acid celobiuronic + glucoză + acid glucuronic) să poată cupla acest polizaharid cu o proteină eterologă, iar cu complexul obţinut, să prepare un ser imun capabil să precipite specific polizaharidul, să aglutineze pneumococul de tipul al III-lea, să protejeze şoarecele infectat cu o doză mortală din acest pneumococ. Astfel s-a putut demonstra posibilitatea obţinerii imunităţii printr-un ser preparat cu un antigen artificial care conţine o haptenă sintetică.

Între antigenele care prezintă o importanţă deosebită pentru bacteriologia medicală trebuie menţionate în special acele de origine microbiană sau *antigenele bacteriene*. Ele sînt reprezentate de anumite componente ale celulei microbiene sau eliberate în mediile de cultură în care se dezvoltă bacteriile, sub formă de toxine.

În general, toxinele bacteriene sînt substanţe de natură *proteică*, întrucît sînt inactivate prin metodele de denaturare a proteinelor, sînt nedializabile, precipită prin precipitanţii obişnuiţi ai proteinelor, sînt insolubile în solvenţii organici şi sînt distruse de enzimele proteolitice. Unele dintre ele — deocamdată puţine la număr — au putut fi obţinute şi în stare cristalizată (de exemplu, toxina difterică, tetanică, botulinică etc.), care prezintă un grad foarte înalt de toxicitate.

Pe lîngă antigenele solubile, pe care bacteriile le eliberează în mediu, corpii microbieni conţin substanţe antigenice care fac parte integrantă din constituţia lor. Acestea, fie acoperă sub formă de mantie suprafaţa corpului microbian (antigene de înveliş,) fie sînt localizate în profunzimea corpului bacterian (antigene somatice), fie, în fine, sînt cuprinse în cilii acestuia (antigenele flagelare). În majoritatea cazurilor se constată că, în constituţia lor, intră o substanţă glucidică complexă, un *polizaharid*, care imprimă caracterul de *specificitate*. Între antigenele microbiene mai bine cunoscute, extrase atît din germenii gram-pozitivi, cît şi din cei gram-negativi, amintim :

Pentru germenii gram-pozitivi :

1. *Antigenele poliozidice pneumococice*, cercetate amănunţit de Avery şi Heidelberger. După cum se ştie, între pneumococi se pot distinge — prin reacţii de aglutinare — numeroase tipuri serologice, a căror specificitate este expresia specificităţii polizaharizilor conţinuţi în capsula germenilor.

Pe lîngă conferirea specificităţii, polizaharizii capsulari sînt răspunzători şi de *virulenţa*, cum şi de cea mai mare parte a *puterii protectoare* (vaccinante) a corpilor microbieni.

La om însă, poliozidele, chiar în stare purificată, manifestă proprietăți vaccinante remarcabile, așa cum a arătat Heidelberger pe un mare număr de recruți din armata americană. Comportarea lor imunologică variază sensibil cu specia animală, la care sînt inoculați ; la *iepure* nu incită elaborare de anticorpi umorali, comportîndu-se ca simple haptene ; la *șoarece*,și mai ales la *om*, determină apariția de precipitine și aglutinine specifice, serul dobîndind, concomitent, putere protectoare față de infecția corespunzătoare. Antigenicitatea se datorește de fapt formării unui complex în care intră pe lîngă polizaharid, și acizi nucleici (nucleoproteină), ceea ce face ca, prin tratare cu ribonuclează, pneumococii omorîți să-și piardă puterea vaccinantă pentru iepure (Dubos). Injectarea la șoarece a unei doze de poliozid cu mult superioară celei necesare vaccinării animalului face ca acesta nu numai să nu se imunizeze, dar să devină încă și mai sensibil față de infecție : fenomenul de „paralizie imunologică" (Felton). De fapt nu se produce o inhibiție veritabilă a elaborării anticorpilor, ci elaborarea lor este insuficientă pentru a scoate din circulație cantitatea enormă de antigen administrată.

Structura antigenică a pneumococilor cuprinde, pe lîngă *polizaharizii capsulari specifici de tip, și o nucleoproteină* legată de corpul microbian, *specifică de specie*, precum și *o substanță „C" poliozidică*, de asemenea specifică de specie. Se pare că formarea polizaharizilor capsulari se află sub dependența unui „factor inductor", identificabil cu acidul dezoxiribonucleic.

2. *Antigenele streptococice* constituie binecunoscutele „grupuri ale lui Lancefield", clasificarea lor (A, B, C... Q) fiind bazată pe specificitatea conferită de o componentă polizaharidică. Grupa A cuprinde majoritatea streptococilor patogeni (peste 40 de tipuri diferite, a căror specificitate este dată de cele două componente antigenice „M" și „T", de natură proteică). Componentele antigenice mai importante sînt : *substanța „P"*, o nucleoproteină specifică ; *substanța „C"*, polizaharid specific de grup, cu funcție de haptenă și care constituie substratul precipitării ; *substanța „M"*, o proteină specifică de tip, antigenică, cu rol important în virulența germenilor și care constituie substratul aglutinării ; *substanța „T"*, de natură chimică încă obscură, este comună mai multor tipuri, și, în fine, un poliozid format din *acid hialuronic*, intrînd în compoziția capsulei germenilor din coloniile mucoide. În ce privește specificitatea propiu-zisă, la streptococi ea este atribuită *proteinei „M"*.

3. *Antigenele stafilococice* sînt mai puțin cunoscute și cuprind atît polizaharizi, cît și substanțe de natură proteică. Pe baza antigenelor polizaharidice și proteice au putut fi deosebite, pînă azi, 13 tipuri serologice.

În ce privește *antigenele germenilor gram-negativi*, echipamentul lor antigenic apare mai omogen, sub raportul caracterelor comune diferitelor categorii aparținînd acestui grup :

1. *Antigenele salmonelelor*, cele mai bine cunoscute, sînt și cele mai importante din grup. Joos a arătat cel dintîi (1903) existența la *S. typhy* a două antigene distincte : unul care conferă germenului proprietatea de a aglutina în flocoane mari : *antigenul „H"*, legat de flageli (antigen „flagelar") și altul care dă o aglutinare fină, cu aspect granular : *antigenul „O"*, legat de corpul microbian (antigen „somatic"). Cel dintîi

este de natură proteică, şi se distruge la o temperatură cu puţin peste 60°, fiind deci termolabil, în timp ce cel de-al doilea, de natură glucido-lipido-polipeptidică (Boivin şi Mesrobeanu) este termostabil. Pe specificitatea acestor două antigene se bizuie întreaga clasificare a salmonelelor, aşa cum a fost propusă de White şi Kauffmann. O importanţă deosebită prezintă antigenul somatic (O), de care depind calităţile de virulenţă şi acele vaccinante ale germenilor. El este prezent numai la variantele virulente (tip „S”) ale acestora, şi se indentifică cu endotoxina lor. Germenii posesori de antigen somatic rezistă mai bine la acţiunea alexinei şi la fagocitoză şi manifestă o capacitate vaccinantă mai mare. Prin hidroliză (încălzire în mediu slab alcalin), antigenul somatic eliberează o fracţiune polizaharidică neantigenică şi netoxică, care precipită specific cu serul corespunzător, ceea ce arată că este purtătoarea specificităţii antigenului complet. S-a văzut chiar, că prin unire cu o fracţiune proteică, provenită de la o altă specie microbiană (de exemplu, *Sh. shiga*), formează un antigen complet. Fracţiunea proteică a acestuia este antigenică, în timp ce aceea lipoidică nu manifestă vreun rol imunogen deosebit. Alături de antigenele „H” şi „O”, Felix şi Pitt au mai indentificat la salmonele şi un al treilea antigen, legat de virulenţa germenilor mai ales pentru şoarece: „*antigenul Vi*”, termolabil, acoperind ca o manta antigenul somatic, pe care-l poate astfel „masca” (pierderea aglutinabilităţii germenilor cu serurile anti-O). Aglutinarea se produce cu serul anti-Vi, avînd un caracter fin, granular.

Toate aceste antigene nu sînt dispuse omogen în cuprinsul unui aceluiaşi germen, ci apar adevărate „mozaicuri antigenice”, care diferă de la un microb la altul, caracteristic fiind numai modul lor de a se grupa. Ţinîndu-se seama de modul de grupare, s-a putut ajunge la o clasificare a germenilor în raport cu repartiţia factorilor lor antigenici, foarte utilă şi pentru scopuri diagnostice. Aşa a fost concepută, în cazul salmonelelor, cunoscuta schemă antigenică de diagnostic a lui Kauffmann. O sistematizare riguroasă este încă anevoiasă, ca urmare a variaţilor antigenice care apar în cuprinsul aceluiaşi antigen, din cauze încă neprecizate,dar care au la bază un substrat genetic.

2. *Antigenele shigelelor* sînt, în mare măsură, asemănătoare celor ale salmonelelor. Endotoxina *Sh. dysenteriae*, identificată de Boivin şi Mesrobeanu ca fiind un antigen glucidolipidic, corespunde de fapt unui complex, rezultat din cuplarea unei fosfolipide cu un polizaharid şi cu un polipeptid (proteină conjugată), a cărui antigenicitate este conferită de combinarea polizaharidului cu polipeptidul, specificitatea fiindu-i imprimată de polizaharid (Morgan).

Antigenele microbiene ale altor specii bacteriene (*Esch. coli*, *Kl. pneumoniae*, *Proteus* etc.) sînt variante ale unor scheme antigenice de tipul celei amintite mai sus, în care pare că factorul antigenic fundamental este de natură glucido-lipido-polipeptidică aşa-numitul „antigen Boivin” — pe lîngă care mai pot apărea şi alte antigene: antigenul flagelar (H), antigenul de înveliş (K) ş.a.m.d.

Structura antigenică nu este o proprietate definitiv fixată a germenilor, ea fiind susceptibilă de variaţii adesea importante, care se realizează sub acţiunea diferiţilor factori externi (compoziţia mediului, variaţiile de temperatură, trecerea prin diverse organisme etc.), după cum poate fi modificată şi prin fenomenul de „inducţie” care constă în conferirea unor proprietăți noi de către un germen unui alt germen de natură diferită, cu care se află în asociație, prin intermediul unor substanțe speciale, elaborate de cel dintîi. Astfel, este binecunoscut că, dacă se inoculează la șoarece pneumococii vii de tip „R" în asociație cu pneumococi omorîți de tip „S" amestecul omoară animalul, la autopsie izolîndu-se pneumococii vii cu caracterele tipului „S". Un fenomen asemănător se observă și *in vitro*, dacă se cultivă pneumococii vii de tip „R" în prezența pneumococilor omorîți de tip „S".

Avery (1944) a arătat că inducerea caracterelor tipului „R" în „S" se datorește acidului dezoxiribonucleic, așa cum a observat și Boivin în cazul bacilului coli.

Pe lîngă aceste antigene microbiene, deosebit de importante pentru microbiologie, mai există și alte numeroase substanțe antigenice, de origine biologică diferită, și anume *antigenele de origine animală.* Se cunosc în prezent patru mari categorii de asemenea „antigene animale", după cum urmează : antigenele celulare (de exemplu, antigenele hematiilor, citoantigenele ; antigenele mediului intern) ; antigenele *parazitare* ; antigenele *veninoase* (veninurile) și antigenele *ubicuitare* sau *eterofile* (antigenele de *tip Forsmann*).

1. *Antigenele celulare* mai cunoscute sînt acelea legate de hematii, corespunzînd aglutinogenilor A și B (sistemul ABO), M și N (sistemul MN), P (factorul O), Rh (factorul Rh-Rhesus), cu rol atît de însemnat în imunohematologie și patologie.

2. *Citoantigenele* se obțin din triturate de țesuturi, ale căror celule posedă calități antigenice (țesut splenic, hepatic, renal, endocrin, nervos etc.). Cu serurile anti obținute prin injectarea lor, se obțin efecte toxice *in vivo* și reacții antigen-anticorp sau inhibarea culturilor de celule *in vitro*.

3. *Antigenele mediului intern* sînt constituite din seroproteinele antigenice (euglobuline, pseudoglobuline, albumine), cum și de un mare număr de alte proteine ale mediului intern, rezultate din metabolism (substanțele de tranzit digestiv, deșeuri etc.).

4. *Antigenele parazitare*, reprezentate de metaboliți ai organismului paraziților de tot felul, sînt încă puțin cunoscute, datorită marei lor complexități structurale. Determină apariția de anticorpi specifici, înlesnind în multe cazuri punerea unui diagnostic prin reacții de fixare (de exemplu echinococoza, leishmanioza, toxoplasmoza, trichinoza, filarioza etc.) ori de precipitare (paludism, chist hidatic), aglutinare (Kala-azar) etc.

5. *Antigenele veninoase* și în special veninurile de șerpi își datoresc antigenicitatea constituției lor proteice (veninul cristalizat al șarpelui cu clopoței este o proteină cu greutate moleculară 30 000).

6. *Antigenele ubicuitare sau eterofile*, denumite și *antigene Forsmann* (antigene „F"), sînt substanțe antigenice cu comunitate antigenică extrem de largă, fiind identificate la un număr foarte mare de viețuitoare : bacterii (*Sh. dysenteriae*, *B. anthracis*, pneumococ), viermi, unele crustacee, moluște și pești, reptile, precum și în hematiile de oaie sau în organele de cobai, cal, cîine, hamster, vulpe, pisică, leu, tigru, ca și la om (de grup Oαβ). Lipsesc în schimb la unele bacterii (vibrionul holeric,

Esch. coli, *Salmonellae*, *M. tuberculosis*, stafilococ etc.), ca şi la bovidee, cimpanzei, *Macacus rhesus*, giboni, iepuri, porumbei, om (grup B α şi O$\alpha\beta$).

Antigenul Forsmann poate incita elaborarea de anticorpi numai în serul speciilor animale, în al căror organism acest antigen lipseşte. Repartiţia lui atît de capricioasă, explică, între altele, toxicitatea pentru cobai a serului de iepure imunizat faţă de hematiile de oaie. În ce priveşte compoziţia lui chimică, aceasta corespunde unui complex glucido-lipidic, care poate fi extras cu alcool, solubil în apă, alcali diluaţi şi piridină, dar puţin solubil în solvenţi organici. Specificitatea este conferită de poliozidele pe care le conţine. Alături de antigenul „F" se mai cunosc şi alte substanţe cu o comunitate antigenică extinsă, care explică reacţiile încrucişate între serurile preparate cu celule provenite din surse foarte variate : de la *Macacus rhesus* la om şi la porc, apoi de la om, cîine şi porc, la om Aβ şi pisică etc. Pare că aceste înrudiri depind de polizaharizii corespunzători (de exemplu ale substanţei de grup A a pneumococului XIV — *B. anthracis* — gonadotrofina chorială de om).

Anticorpii

Sînt substanţele specifice care apar în umori, ca răspuns la incitarea provocată de introducerea în organism — de regulă parenterală — a substanţelor antigenice, cu care se combină electiv. Anticorpii pot apărea în sînge (ser), limfă şi în anumite condiţii şi în lichidul cefalorahidian : anticorpi „umorali", după cum pot şi rămîne legaţi de celule : anticorpi „celulari" sau „sesili". În sînge, ei se caută în serul sanguin (anticorpi serici).

După cum se ştie, sîngele total se separă, după coagulare, în cheag şi ser ; dacă este tratat cu un anticoagulant (de exemplu, heparină, citrat de sodiu, oxalat de litiu) şi apoi centrifugat, elementele figurate se separă de partea lichidă : plasma. Serul are aceeaşi compoziţie cu plasma, mai puţin fibrinogenul şi trombina. El cuprinde diverse substanţe anorganice solubilizate, compuşi organici mai mult sau mai puţin simpli şi o mare cantitate de proteine. Proteinele serice constituie, după gradul lor de solubilitate, două mari clase : *albuminele* (solubile în apă şi în sulfat de amoniu 50%) şi *globulinele* care la rîndul lor, pot fi insolubile : globuline adevărate sau *euglobuline* sau hidrosolubile : *pseudoglobuline*.

Încă de la primele cercetări asupra naturii anticorpilor, s-a constatat că aceştia precipită, o dată cu globulinele, ceea ce a sugerat ideea că anticorpii înşişi sînt *globuline serice*, de o factură specială. În vederea individualizării lor în raport cu globulinele normale, au fost cercetate amănunţit caracterele fizico-chimice pe care le prezintă :

a) *Caracterele fizice* ale globulinelor-anticorp au fost studiate prin metoda ultrafiltrării, a ultracentrifugării şi a electroforezei. Prin ultracentrifugare, s-a precizat că greutatea moleculară a anticorpilor este de acelaşi ordin de mărime cu aceea a globulinelor normale (150 000—900 000). La electroforeză s-a constatat că moleculele-anticorp migrează de obicei o dată cu γ-globulinele şi că elaborarea lor în ser, în timpul imunizării, este proporţională cu creşterea acestora din urmă. Rezultă că datele fizice pledează pentru *natura globulinică* a anticorpilor.

b) *Caracterele chimice* pledează în acelaşi sens. Agenţii chimici, care afectează proteinele (alcoolul, formolul, iodul), afectează şi anticorpii. Compoziţia acestora (procentul şi natura aminoacizilor) nu diferă esenţial de cea a seroproteinelor. Anticorpii se arată a fi holoproteine, formate din amino-acizi, lipsite de grupări prostetice şi conţinînd o mică cantitate (de ordinul a 0,5%) glucide. Metodele moderne de fracţionare şi purificare au permis totuşi separarea seroproteinelor inactive de anticorpii specifici. Aceste metode se bazează pe faptul că moleculele anticorp rezistă mai bine decît celelalte proteine serice, la acţiunea enzimatică a proteazelor (digestie pepsică cu încălzire blîndă şi precipitare salină). Felton a arătat că prin precipitare cu alcool la rece (—5°) şi prin variaţia concentraţiilor saline şi de pH, se obţine o purificare satisfăcătoare a anticorpilor, eliminîndu-se aproape în totalitate proteinele inactive. Cohn, folosind concentraţii crescînde de alcool la rece, a putut separa şase fracţiuni de proteine plasmatice (I-a—VI-a), arătînd că anticorpii din serul uman se regăsesc între fracţiunea a II-a (γ-globuline) şi fracţiunea a III-a (amestec de β- şi γ-globuline). Metoda este folosită pentru prepararea de fracţiuni cu anticorpi specifici, pentru scopuri terapeutice (de exemplu, seroprofilaxia rujeolei).

Pentru prepararea pe scară mare de anticorpi *purificaţi*, se foloseşte, în general, metoda lui Parfentiew, bazată pe acţiunea proteolitică a pepsinei asupra serurilor, cu degradarea serumproteinelor nespecifice, şi conservarea celor corespunzătoare anticorpilor.

Cu toată fineţea şi precizia lor, metodele fizico-chimice folosite pînă în prezent nu sînt suficiente pentru a preciza ce anume conferă unei globuline funcţia de anticorp. De aceea se presupune că nu structurile primare ci structurile secundare ale moleculelor globulinice ar fi responsabile de conferirea acestei funcţii.

c) *Caracterele fiziologice* se referă la modul în care sînt elaboraţi anticorpii de către organismul care a primit stimulul antigenic. Aceştia nu apar imediat după administrarea antigenului. Între momentul injectării de antigen şi cel al apariţiei anticorpilor există *o perioadă de latenţă*, în medie de 6—12 zile, necesară procesului de elaborare. Din momentul apariţiei lor, proporţia sau titrul anticorpilor creşte progresiv pînă la un maximum, după care scade, la început rapid, apoi tot mai lent, în decursul unei perioade de timp foarte variabile (de la cîteva săptămîni pînă la cîţiva ani). Procesul de elaborare este influenţat, în mare măsură, de doi factori: *cantitatea de antigen* injectat şi *frecvenţa injecţiilor*. Cu cît doza de antigen este mai mare, cu atît titrul anticorpilor este, pînă la o anume limită, mai ridicat. Dacă doza unică masivă este administrată fracţionat (în cîteva doze mai mici, repetate), efectul obţinut este mai mare (titru mai ridicat). După ce un anticorp specific, apărut după injectarea antigenului corespunzător, a dispărut un timp din circulaţie, el reapare mai curînd şi într-un titru mai ridicat după reinjecţia ulterioară a aceluiaşi antigen. Fenomenul se petrece ca şi cum organismul şi-ar „reaminti" de antigenul dispărut, reacţionînd mai prompt şi mai intens la un nou contact cu acesta, de unde şi denumirea de „reacţie anamnestică", care s-a dat fenomenului. Reacţia anamnestică stă la baza injecţiilor de „rappel", în special în vaccinările cu anatoxine, în vederea obţinerii unei creşteri a titrului anticorpilor după reinjecţia antigenului, după o perioadă mai mult sau mai puțin îndelungată de timp de la începutul imunizării. Creșterea intensității răspunsului se poate obține și prin administrarea unor antigene de altă natură decît antigenul omolog, ori chiar prin introducerea unor substanțe neantigenice prin ele însele, cunoscute sub numele de „adjuvanți” (de exemplu, tapioca, alaunul, lanolina, $CaCl_2$ etc.). Toate aceste fenomene se bazează pe principiul *sinergiei antigenice*. Dacă antigenele administrate simultan diferă semnificativ în ce privește doza, anticorpii specifici sînt elaborați numai față de antigenul injectat în doza cea mai mare; este fenomenul de *concurență antigenică*. Aceste constatări arată că, în procesul de elaborare a anticorpilor, intervin atît factori specifici, cît și factori nespecifici.

d) *Caracterele de specificitate* privesc, pe de o parte, specificitatea anticorpilor față de antigenele corespunzătoare și pe de alta specificitatea lor față de organismul în care iau naștere. În general, se consideră că oricare ar fi modul de manifestare a unui anticorp față de antigenul omolog (precipitare : precipitină ; aglutinare : aglutinină ; opsonizare : opsonină ; bacterioliză : bacteriolizină), anticorpul specific este de fapt unul singur. Această concepție stă la baza *teoriei unitare a anticorpilor*. Astfel, spre pildă, antigenul somatic „O” provoacă elaborarea de anticorpi „O” care pot aglutina corpii microbieni cărora le aparține antigenul, complexul format poate fixa alexina și favoriza fagocitoza, după cum poate da naștere și la fenomenul de precipitare. Dacă antigenul este complex, adică se prezintă din punct de vedere antigenic ca un „mozaic de antigene”, organismul elaborează în prezența lui, concomitent, mai mulți anticorpi specifici. În ce privește specificitatea anticorpilor față de organismul însuși, care îi elaborează, s-a constatat că serurile specifice, provenite de la specii animale diferite, nu posedă aceleași calități imunologice : de exemplu, un ser antipneumococic preparat pe cal, și unul preparat pe iepure, diferă sensibil în ce privește puterea protectoare pe care ele o manifestă față de infecția pneumococică experimentală a șoarecelui. Deosebiri de același ordin se constată și în cuprinsul unei aceleiași specii : serurile preparate cu același antigen pe mai mulți iepuri se deosebesc semnificativ între ele în ce privește cantitatea de anticorpi specifici elaborați (titrul), cu toate că doza de antigen administrat animalelor a fost aceeași.

Locul de formare a anticorpilor a constituit și constituie o problemă care continuă să fie dezbătută și astăzi. Primele cercetări păreau să arate că aceștia s-ar forma în serul sanguin, dar constatarea prezenței lor în țesuturi precedînd apariția în ser pe de o parte și faptul că toate umorile din organism au o origine celulară pe de alta, a făcut ca ipoteza *originii celulare a anticorpilor* să devină verosimilă.

Încă de la 1898, Pfeiffer și Marx arătaseră că, la scurt timp după injectarea unui antigen, anticorpii corespunzători pot fi puși în evidență mai întîi în splină, ganglionii limfatici și măduva oaselor, și numai ulterior în sînge. Brezygode a arătat mai apoi că țesuturile cultivate *in vitro* din aceste organe elaborează în culturi anticorpi specifici. Întrucît aceste organe sînt foarte bogate în elemente reticulo-endoteliale, s-a presupus că locul de formare a anticorpilor s-ar situa la nivelul celulelor sistemului reticulo-endotelial (S.R.E.). Această presupunere s-a extins apoi datorită faptului că anticorpii sînt serumglobuline, la toate elementele formatoare de globuline: *celule reticulo-endoteliale, celulele limfatice și celulele plasmatice.*

1. *Sistemul reticulo-endotelial* (S.R.E.), cu o atît de largă răspîndire în organism, pare a participa în cea mai largă măsură la procesul de elaborare a anticorpilor. Blocarea lui prin diferite mijloace (cu tuș de China, raze X, toluen, splenectomie) duce la o scădere notabilă a titrului de anticorpi. Introducerea în organism a unui antigen colorat (proteină-R sau azobenzidin-azo-ovalbumin) indică o persistență a acestuia în celulele S.R.E. pînă în momentul apariției anticorpilor, coincizînd cu decolorarea celulelor.

2. *Celulele limfatice* (limfocitele) ar participa la geneza anticorpilor pe seama conținutului lor în γ-globuline, eliberate după disoluție sub influența hormonilor adrenocorticali. Rolul limfocitelor pare a fi atestat în special de marea abundență de anticorpi din limfaticele eferente ale ganglionilor limfatici.

3. *Celulele plasmatice* sînt considerate de unii autori ca formatoare de anticorpi, în urma constatării unei acumulări a lor în măduva oaselor, proporțional cu curba elaborării anticorpilor. Totodată s-a constatat că hiperimunizarea determină o proliferare importantă a celulelor plasmatice în splină, ca și la nivelul țesutului adipos perirenal, care nu se constată după injectarea de substanțe neantigenice (Byorneboe). Fagraeus a pus în evidență elaborarea de anticorpi la nivelul explantelor splenice ale animalelor injectate în prealabil cu antigen, arătînd că pulpa roșie, care conține numeroase plasmocite, produce o mare cantitate de anticorpi, titrul acestora fiind direct proporțional cu procentul celulelor plasmatice din pulpă. Autoarea crede că elaborarea anticorpilor în cultură se datorește *plasmocitelor imature*, pe cale de formare din celulele reticulo-endoteliale intens bazofile; bazofilia este expresia unei concentrații crescute de ribonucleotide citoplasmatice, traducînd o sinteză activă de proteine.

În concluzie, ipoteza ~~*originii celulare a anticorpilor*~~ este confirmată de fapte experimentale tot mai numeroase și rolul elementelor de *origine reticulo-endotelială* în geneza lor apare tot mai precis. Dar pe lîngă acestea trebuie luată în considerare și eventuala participare a altor elemente, histologic diferite, procesul de elaborare, așa cum afirmă *teoria ubicuitară* a originii anticorpilor.

Mecanismul de formare a anticorpilor a fost și continuă să rămînă încă mult discutat. Ehrlich, printre cei dintîi, a emis o ipoteză care încearcă să explice acest mecanism, bizuindu-se pe fenomenul fixării toxinelor pe celulele sensibile. El presupune că această fixare s-ar face prin intermediul unor *receptori celulari specifici* pe care celula sensibilă i-ar poseda spre suprafața ei, și care au o afinitate selectivă pentru fiecare antigen. Fixînd antigenele, receptorii sînt „blocați”, ceea ce face ca celula producătoare să elibereze o cantitate mărită de noi receptori (*reacție compensatoare*); acești noi „receptori regenerați” și revărsați în circulație ar constitui *anticorpii*. Ipoteza nu mai prezintă decît un interes istoric, ea fiind infirmată de fapte experimentale importante. Între acestea menționăm existența *haptenelor* care, deși se pot uni cu anticorpii, nu pot incita elaborarea lor, ori faptul că *anatoxinele*, deși păstrează calitățile antigenice ale toxinelor de origine, nu sînt adsorbite de celulele toare de globuline: *celule reticulo-endoteliale, celulele limfatice și celulele plasmatice.*

1. *Sistemul reticulo-endotelial* (S.R.E.), cu o atît de largă răspîndire în organism, pare a participa în cea mai largă măsură la procesul de elaborare a anticorpilor. Blocarea lui prin diferite mijloace (cu tuș de China, raze X, toluen, splenectomie) duce la o scădere notabilă a titrului de anticorpi. Introducerea în organism a unui antigen colorat (proteină-R sau azobenzidin-azo-ovalbumin) indică o persistență a acestuia în celulele S.R.E. pînă în momentul apariției anticorpilor, coincizînd cu decolorarea celulelor.

2. *Celulele limfatice* (limfocitele) ar participa la geneza anticorpilor pe seama conținutului lor în γ-globuline, eliberate după disoluție sub influența hormonilor adrenocorticali. Rolul limfocitelor pare a fi atestat în special de marea abundență de anticorpi din limfaticele eferente ale ganglionilor limfatici.

3. *Celulele plasmatice* sînt considerate de unii autori ca formatoare de anticorpi, în urma constatării unei acumulări a lor în măduva oaselor, proporțional cu curba elaborării anticorpilor. Totodată s-a constatat că hiperimunizarea determină o proliferare importantă a celulelor plasmatice în splină, ca și la nivelul țesutului adipos perirenal, care nu se constată după injectarea de substanțe neantigenice (Byorneboe). Fagraeus a pus în evidență elaborarea de anticorpi la nivelul explantelor splenice ale animalelor injectate în prealabil cu antigen, arătînd că pulpa roșie, care conține numeroase plasmocite, produce o mare cantitate de anticorpi, titrul acestora fiind direct proporțional cu procentul celulelor plasmatice din pulpă. Autoarea crede că elaborarea anticorpilor în cultură se datorește *plasmocitelor imature,* pe cale de formare din celulele reticulo-endoteliale intens bazofile; bazofilia este expresia unei concentrații crescute de ribonucleotide citoplasmatice, traducînd o sinteză activă de proteine.

În concluzie, ipoteza *originii celulare a anticorpilor* este confirmată de fapte experimentale tot mai numeroase și rolul elementelor de *origine reticulo-endotelială* în geneza lor apare tot mai precis. Dar pe lîngă acestea trebuie luată în considerare și eventuala participare a altor elemente, histologic diferite, procesul de elaborare, așa cum afirmă *teoria ubicuitară* a originii anticorpilor.

Mecanismul de formare a anticorpilor a fost și continuă să rămînă încă mult discutat. Ehrlich, printre cei dintîi, a emis o ipoteză care încearcă să explice acest mecanism, bizuindu-se pe fenomenul fixării toxinelor pe celulele sensibile. El presupune că această fixare s-ar face prin intermediul unor *receptori celulari specifici* pe care celula sensibilă i-ar poseda spre suprafața ei, și care au o afinitate selectivă pentru fiecare antigen. Fixînd antigenele, receptorii sînt „blocați", ceea ce face ca celula producătoare să elibereze o cantitate mărită de noi receptori (*reacție compensatoare*); acești noi „receptori regenerați" și revărsați în circulație ar constitui *anticorpii*. Ipoteza nu mai prezintă decît un interes istoric, ea fiind infirmată de fapte experimentale importante. Între acestea menționăm existența *haptenelor* care, deși se pot uni cu anticorpii, nu pot incita elaborarea lor, ori faptul că *anatoxinele*, deși păstrează calitățile antigenice ale toxinelor de origine, nu sînt adsorbite de celulele fixatoare de toxine ş. a.m.d. Gamaleia consideră că receptorii nu preexistă în celulă, ci sînt elaboraţi de aceasta, ca un răspuns la incitaţia antigenică. Antigenele, acţionînd asupra coloizilor celulari în virtutea principiului Le Chatelier, determină în celulă modificări structurale corespunzătoare antigenului, dar în sens opus. Acesta lasă în celula cu care a venit în contact o ,,amprentă'' care, după eliminare, va manifesta o afinitate specifică pentru antigenul care i-a dat naştere. Aşadar, anticorpul reprezintă un adevărat mulaj al antigenului, cu care se poate astfel uni în modul cel mai perfect. Kulikov presupunea că elaborarea anticorpilor ar corespunde unui fenomen de echilibru ionic. Aportul de ioni în organism (,,ionogeni'') determină o rupere a acestui echilibru şi provoacă totodată elaborarea unor ioni antagonişti (,,anti-ioni''), care tind să restabilească echilibrul normal. O altă ipoteză, după care anticorpii ar rezulta din încorporarea moleculelor de antigen de către proteinele organismului care le-ar conferi automat caracterul de specificitate, a fost părăsită din cauza neconcordanţei cu datele experimentale (de exemplu, neconcordanţa dintre cantitatea foarte mică de antigen necesară incitării antigenice şi cantitatea mult mai mare de anticorpi omologi care apar ca răspuns). Haurowitz şi Breinl, şi apoi Alexander, Mudd, atribuie un rol deosebit antigenelor asupra celulelor producătoare de anticorpi, şi consideră formarea anticorpilor ca un aspect particular al procesului de sinteză a proteinelor (serumglobulinelor), care are loc sub acţiunea directă a antigenului cu care celula producătoare intră în contact. Antigenul se leagă prin intermediul grupărilor determinante, de peptidele sau aminoacizii globulinei pe cale de sinteză enzimatică. O dată formată, globulina se detaşează la un moment dat de antigen, însă păstrează amprenta stereochimică a acestuia, care va marca succesiv toate moleculele de globulină ce se vor mai sintetiza, şi care vor deveni libere prin descompunerea celulelor S.R.E. Mecanismul intim al procesului ar comporta trei faze. Într-o primă fază are loc o adsorbţie specifică a aminoacizilor dimprejur, de către aminoacizii omologi prezenţi în ,,filmul'' sau ,,pelicula'' proteinică, formîndu-se astfel un nou ,,film'' complementar. Într-o a doua fază, acesta se leagă de cel dintîi graţie unor enzime nespecifice de tipul catepsinelor. Într-o ultimă fază, el se disociază, formînd un edificiu molecular proteic tridimensional. Molecula de globulină suferă astfel o modificare a forţelor polare sau a configuraţiei ei stereochimice. Pauling crede şi el că anticorpii sînt molecule de globulină ,,mulate'' pe moleculele de antigen, neprecizînd însă dacă mularea se produce în chiar celula care

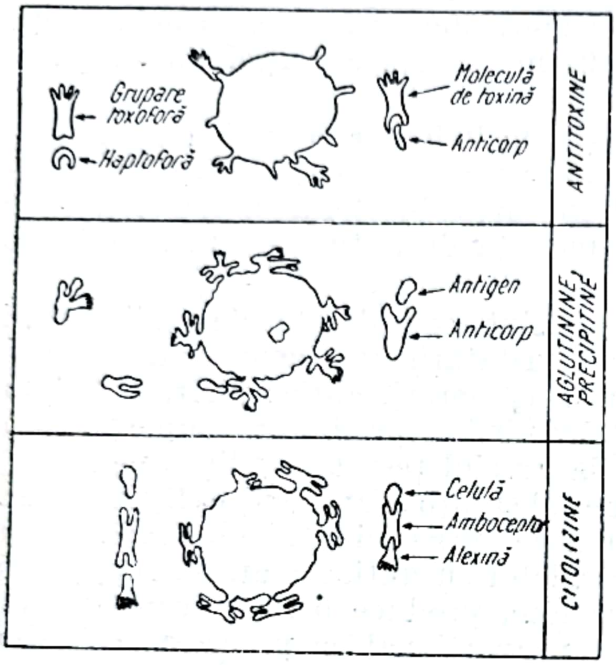


Fig. 78 — Schema teoriei ,,receptorilor'' Ehrlich.

sintetizează globulina-anticorp, sau apare ulterior. După acest autor, distincția dintre globulina normală și cea „imună" nu se datorește atît orientării radicalelor de aminoacizi, cît modului diferit în care se „pliază" lanțurile polipeptidice, și în special felului în care sînt „torsionate" capetele acestor pliuri, sub influența grupărilor determinante ale antigenului (formarea de „structuri complementare"). Rezultatul acestor orientări reciproce este că molecula-antigen apare ca „replica" sau „negativul" moleculei anticorp, așa încît structurile secundare ale ambelor molecule, corespund întocmai. Bazele experimentle ale acestor ipoteze seducătoare, care consideră moleculele-anticorp ca rezultînd din „mulajul" globulinei pe molecula-antigen ce îi servește de „tipar", nu sînt suficient de solide. Ele nu explică de pildă cum se face că forțele atît de mari care unesc cele două molecule se rup la un moment dat, pentru a elibera anticorpii și nici cum de este posibilă „reacția anamnestică", o dată ce se admite că formarea anticorpilor depinde atît de strict de prezența, în acel moment, a moleculelor de antigen. Burnet și Fenner (1949) și mai apoi Schweet și Owen (1957) cred pe de o parte că antigenul modifică sistemul enzimatic de sinteză a anticorpilor, și că, pe de altă, capacitatea de a sintetiza anticorpi se transmite ereditar; prin urmare, prezența antigenului nu este necesară pentru păstrarea capacității de sinteză. Ei consideră că mulajul moleculei antigen nu s-ar imprima direct pe molecula de globulină-anticorp, ci pe complexul enzimatic răspunzător de sinteza proteinelor (proteinaze) care, astfel „marcat", devine capabil să elaboreze globuline-anticorp chiar în lipsa antigenelor. Cu alte cuvinte, serumglobulinele sintetizate de proteinazele intracelulare, în prezența antigenului, pot deveni anticorpi prin modificarea proteinazei și autoreproducerea ei, concomitent cu distrugerea antigenului. Grabar pornind de la proprietatea globulinelor de a transporta — după o prealabilă fixare — diverse substanțe (deșeuri de catabolism celular, hormoni etc.), consideră că „funcția anticorp" a unei globuline reprezintă un aspect particular al funcției fiziologiei de fixare și transport a globulinelor.

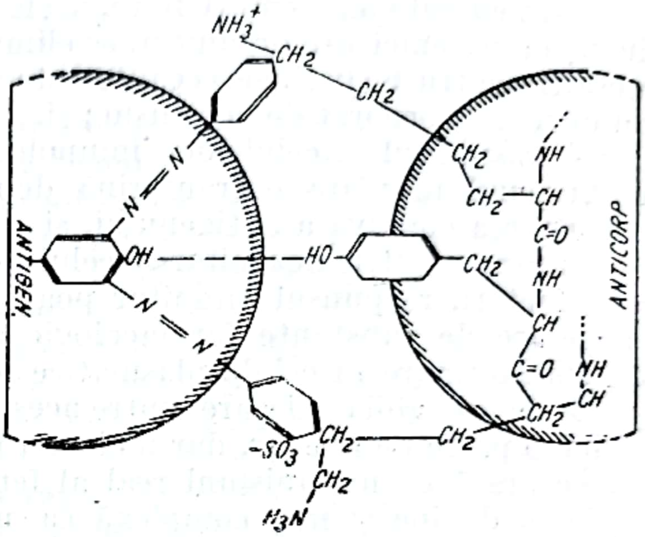


Fig. 79. — Schema probabilă după care structurile de suprafață ale moleculei anticorp se leagă de acelea ale suprafeței moleculei unui antigen sintetic conjugat (proteină nativă cuplată cu acid metanilic diazotat) (Boyd).

Burnet și Talmage, au mai propus și o „teorie a selecției clonale", care ar explica modificările conținutului în anticorpi și rezistența față de infecții, printr-un *proces genetic* sau epigenetic ce afectează *populația celulelor mezenchimale.* Teoria se bizuie pe următoarele considerente:

— fenomenele de imunitate în general, se bazează pe prezența în organism de „clone" de celule „imunologic-competente" care, pe de o parte reacționează direct cu determinanții antigenici corespunzători, iar pe de alta pot produce sau face să se multiplice celulele capabile să sintetizeze sau să elaboreze anticorpi ;

— o mare parte din clonele necesare acoperirii tuturor „tiparelor" antigenice posibile, apar şi se dezvoltă în cursul diferenţierii embriologice printr-un proces bazat pe mutabilitatea exagerată a unei anume porţiuni din genom ; urmează o reducere progresivă a acestei mutabilităţi, suficientă pentru a stabiliza diferitele tipare produse prin mutaţii întîmplătoare ;

—în cursul vieţii embrionare, acele clone care reacţionează cu determinanţii antigenici din organism, se elimină, şi astfel „informaţia" devine necesară pentru a distinge ceea ce este propriu de ceea ce este impropriu de a fi încorporat de organism ; şi, în fine :

— răspunsul „celulelor imunologic competente" la contactul cu antigenul în viaţa extrauterină depinde de : starea lor fiziologică, concentrarea efectivă a antigenului, şi de dispunerea unui loc convenabil în organism, pentru dezvoltarea celulelor stimulate. În funcţie de toţi aceşti factori, răspunsul imunitar poate fi : o inhibare sau o distrugere, o eliberare de substanţe farmacologic active, sau o proliferare cu sau fără transformare în celule plasmatice formatoare de anticorpi (Burnet).

Este probabil că fiecare dintre aceste ipoteze ale formării anticorpilor conţine o parte de adevăr, dar nici una nu apare ca deplin satisfăcătoare, ceea ce arată că mecanismul real al fenomenului nu este încă elucidat. Problema devine şi mai complexă ca urmare a participării la mecanismul de formare a *sistemului endocrin* (în special a celui hipofizo-cortico-suprarenal), a *sistemului nervos vegetativ*, care apare tot mai evidentă pe măsură ce datele experimentale se înmulţesc, ca şi a *sistemului nervos central*, care joacă un rol important în apariţia procesului imunologic.

Reacţiile antigen-anticorp

Reacţiile antigen-anticorp care se produc atunci cînd moleculele de antigen întîlnesc şi se unesc electiv cu cele ale anticorpilor corespunzători, constituie unul dintre fenomenele fundamentale ale imunologiei. Mecanismul şi legile după care se conduc aceste reacţii sînt numai în parte cunoscute, cu tot numărul foarte mare de cercetări care s-au făcut pentru lămurirea lor.

1. Ehrlich credea că reacţiile antigen-anticorp se supun *legii multiplilor,* unirea antigenilor cu anticorpul corespunzător producîndu-se în *proporţii invariabile* (de tipul reacţiei chimice dintre acidul clorhidric şi hidratul de sodiu), spre a se ajunge la formarea unui compus unic, indiferent de proporţiile reactivilor care intră în reacţie. După această ipoteză, dacă unul dintre reactivi este în exces, el poate fi regăsit neschimbat, alături de compusul format. Concepţia lui Ehrlich s-a arătat însă în dezacord cu unele fapte experimentale observate chiar de el însuşi, ca de pildă faptul că doze mici de antitoxină pot neutraliza o cantitate mai mare de toxină decît dozele mari.

De exemplu, se ştie că „echivalentul antitoxic" este doza de antitoxină care poate neutraliza o doză limită mortală (1.D.L.M.) de toxină. Dar s-a văzut că dacă la 100 D.L.M.de toxină difterică, în loc de doza capabilă să neutralizeze aceste 100 D.L.M. toxină (adică 100 echivalente antitoxice), se adaugă numai un sfert din această doză (deci 25 echivalente antitoxice), se obține un amestec care — după ipoteza lui Ehrlich — ar trebui să omoare 75 de cobai, dar care, în realitate, conține o cantitate de toxină mult inferioară celor 75 D.L.M.

2. Arrhenius și Madsen încearcă să explice dezacordul, presupunînd că în reacție intervine *legea acțiunii de masă* a lui Guldberg și Waage, asimilînd reacțiile antigen-anticorp cu reacțiile chimice reversibile dintre un acid și o bază slabă, de tipul :

acid acetic + etanol ⇄ acetat de etil + apă, sau :

$$MgCl_2 + 2NH_4OH \rightleftharpoons Mg(OH)_2 + 2NH_4Cl.$$

În aceste reacții, în care afinitățile dintre reactori sînt relativ slabe se ajunge la un echilibru care corespunde, pentru o anumită temperatură, unui raport constant între produsul concentrațiilor reactorilor rămași liberi, și produsul concentrațiilor substanțelor rezultate din reacție. Cercetările de control au arătat însă ulterior că reversibilitatea reacțiilor nu se conformează legii lui Guldberg și Waage.

Bordet emite o ipoteză mai conformă cu faptele de observație. El pleacă de la premisa că, întrucît antigenul și anticorpul sînt substanțe de natură *coloidală*, afinitatea dintre ele și deci unirea lor trebuie să fie supusă legilor chimiei coloizilor. Unirea nu urmează legii proporțiilor multiple, cum credea Ehrlich, ci în raport cu cantitatea de antigen sau de anticorp introdusă, ea se face în *proporții variabile*, ducînd la apariția unor complexe variate, cu o tendință slabă de disociere spontană. Așadar, structura complexului format nu este aceeași, indiferent de raporturile cantitative dintre elementele care participă la reacție. Reacția ar fi comparabilă cu ceea ce se petrece atunci cînd un corp adsorbant se impregnează cu un colorant ; de pildă, dacă se introduce dintr-o dată o sugativă într-o baie cu colorant (soluție relativ slabă de albastru de metilen), sugativa se va colora uniform, dar dacă este introdusă de cîteva ori pe porțiuni și la intervale convenabile, primele porțiuni introduse se vor colora într-un albastru mai intens, iar cele mai din urmă, vor căpăta o colorație tot mai slabă. Fenomenul sugerează ceea ce se petrece în cursul unui important fenomen imunologic, cunoscut sub numele de *fenomenul Danysz*, pe care singură teoria Bordet îl poate explica : dacă la un amestec în cantități echivalente de toxină cu antitoxină se mai adaugă *o singură dată* un surplus de toxină, amestecul nu se arată toxic. Dacă însă toxina este adăugată *fracționat*, amestecul devine toxic, ca și cum, combinarea făcîndu-se în proporții variabile, o primă adăugare de toxină ar fi captat tot disponibilul de anticorpi, adaosurile ulterioare rămînînd intacte. Aceasta presupune, evident, o reversibilitate foarte slabă, și uneori chiar o lipsă de reversibilitate a unirii antigenului cu anticorpul.

M. Nicolle credea că unirea dintre antigen și anticorp este un fenomen de adsorbție coloidală, în care partea activă a miceliilor proteice este lipsită de antigenicitate, în timp ce aceea granulară este antigenică. Cînd cei doi reactivi sînt în proporții optime, reacția este datorită afinității lor reciproce.

V. A. Barîkin socotea, dimpotrivă, că antigenicitatea ar fi legată de partea activă și nu de cea granulară a miceliului proteic. El consideră, ca și Bordet, că substratul reacției este un fenomen de adsorbție coloidală, a cărui desfăşurare depinde de stabilitatea adsorbţiei, de reacţiile de substituţie posibile, şi de interacţiunea chimică dintre antigen şi anticorp.

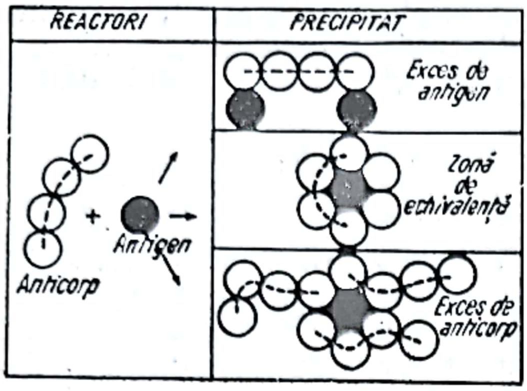

REACTORI
PRECIPITAT
Exces de antigen
Zonă de echivalenţă
Anticorp
Antigen
Exces de anticorp

Fig. 80. — Modul probabil de combinare între anticorp (format din cuplarea a 4 unităţi, fiecare avînd o greutate moleculară = = 40 000), cu un antigen de o greutate moleculară = 40 000 (tip ovalbumină) şi formarea celor 3 zone ale reacţiei de precipitare (Boyd).

Heidelberger şi Kendall au aprofundat, în lumina datelor mai noi ale imunochimiei, cercetările asupra interacţiunii dintre antigen şi anticorp, mai cu seamă sub raport cantitativ. Aceste cercetări, care au confirmat în mare măsură teoria Bordet, s-au referit în special la analiza compoziţiei precipitatelor specifice, cu ajutorul antigenelor purificate de tipul poliozidului pneumococic tipul al III-lea. Acest poliozid, fiind lipsit de azot, permite ca prin dozarea azotului în precipitatele formate cu anticorpii omologi, să se obţină proporţia de antigen şi de anticorp dintr-un precipitat. Astfel, cantitatea de anticorp, precipitat, exprimat în mg de azot, este egală cu :

$$2RS = \frac{R^2 S^2}{A}$$

în care : S = antigenul ; A = anticorpul ; R = raportul antigen/anticorp, în precipitat, la centrul zonei de echivalenţă. Determinînd valoarea raportului dintre cantitatea de anticorpi şi cea de antigen, în precipitatele formate de amestecurile antigen-anticorp în proporţii diferite, se constată că această valoare nu numai că nu este invariabilă, dar, în acord cu teoria lui Bordet, este cu atît mai mare, cu cît proporţia de anticorpi din amestecul respectiv este şi ea mai mare. Consecinţele practice care decurg din aceste cercetări sînt de cel mai mare interes. Astfel, de pildă, întrucît precipitarea anticorpului este totală, atunci cînd ameste-

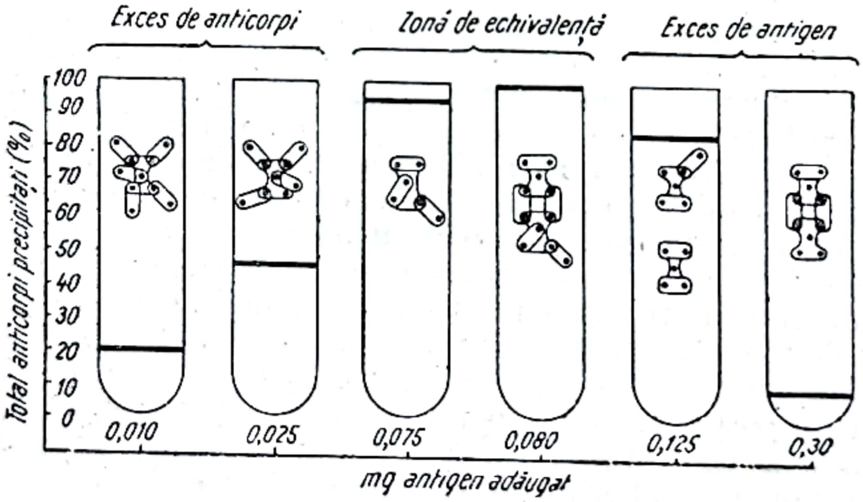

Exces de anticorpi
Zonă de echivalenţă
Exces de antigen
Total anticorpi precipitaţi (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0,010
0,025
0,075
0,080
0,125
0,30
mg antigen adăugat

Fig. 81 — Reacţia antigen-anticorp *in vitro* (Raffel).

cul antigen-anticorp se face în proporții optime, devine posibilă ca, prin determinări cantitative, să se poată preciza conținutul în anumiți anticorpi dintr-un ser dat.

Pe această cale, Heidelberger a putut arăta, spre exemplu, că procentul de anticorpi, elaborați de un organism imunizat față de poliozidul pneumococic, reprezintă pînă la de 25 000 de ori greutatea antigenului administrat.

Marrack și Pauling, plecînd de la presupunerea că antigenele și anticorpii ar fi *multivalenți*, adică ar poseda cel puțin două grupări polare active și complementare, au sugerat teoria „*complementarismului și multivalenței*" acestora. Pentru Marrack, prin unirea moleculelor de antigen cu cele de anticorp, grupările polare (de care depinde solubilitatea globulinei anticorp) sînt îndreptate reciproc unele spre celelalte, ceea ce are ca efect neutralizarea și tendința lor la precipitare. După cum se știe, capacitatea moleculelor de a rămîne dispersate în apă (*liofilia*) este un fenomen datorit atracției dintre grupele polare și moleculele de apă. Prin neutralizarea grupărilor polare, rezultă un complex cu liofilia foarte redusă, și care devine foarte sensibilă la acțiunea floculantă a electroliților. Aceasta explică de ce precipitarea se face mai bine pentru proporții definite de antigen și de anticorp, care asigură o neutralizare maximă a grupărilor polare. Dacă unul din reactori rămîne în exces față de celălalt, după reacție el își păstrează numeroase valențe secundare libere, care tind să mențină complexul în stare dispersă. Alături de liofilie, complexele se formează și datorită jocului valențelor multiple, adică multivalenței reciproce a reactorilor. Astfel, de pildă, dacă am considera unirea dintre un antigen hexavalent și un anticorp trivalent, în cazul unui mare exces de antigen, toate cele trei valențe ale anticorpului sînt satisfăcute de antigen, iar soluția este formată din complexe cuadrimoleculare, care nu se mai pot combina între ele spre a forma altele mai mari, din cauză că numai valențele antigenului rămîn nesatisfăcute. Dacă excesul de antigen este mai redus, complexele rezultate sînt de tipul figurat în A_1, însă ele nu se mai pot reuni, deoarece numai valențele antigenului sînt nesatisfăcute. Excesul de anticorpi duce la formarea de complexe figurate în B și B_1, iar la punctul de echivalență dispoziția elementelor în complex devine *alternantă și reticulată*, așa cum este figurată în C, de unde și denumirea de „teorie a rețelei", sau a „alternanței", sub care este cunoscută această concepție.

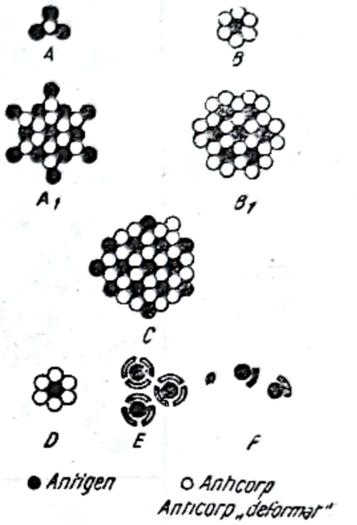


Fig. 82. — Schema reprezentării diferitelor complexe antigen-anticorp, după teoria „rețelei" (*A—C*) și a ipotezei celor 2 faze (*D—F*) (Topley).

Pauling socoate anticorpul bivalent, iar antigenul polivalent și imaginează structura agregatelor așa cum se arată în fig. 82 (A—C). În A, valențele anticorpului și ale antigenului sînt complet saturate, structura complexului, devine foarte densă și proporțiile lui cresc pînă la precipitare. În B, este reprezentată structura agregatului în cazul unui exces de anticorpi; numeroase molecule de anticorp au valențe libere, iar structura complexului apare spongioasă, cu o mare cantitate de solvent. După un timp ceva mai îndelungat, se vor forma agregate care vor precipita, dar dacă excesul de anticorp este mare, grupările determinante ale antigenului sînt saturate complet și se formează mici agregate fără

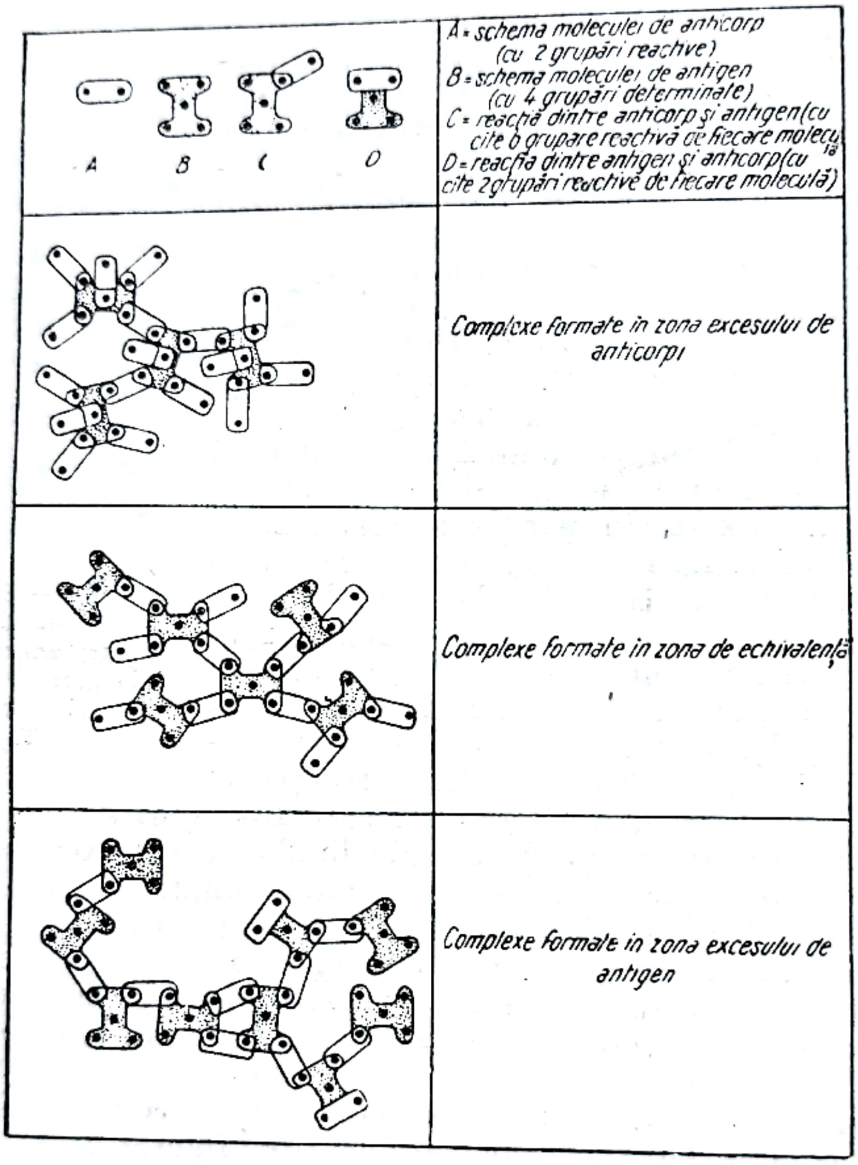

A
B
C
D
A = schema moleculei de anticorp (cu 2 grupări reactive)
B = schema moleculei de antigen (cu 4 grupări determinate)
C = reacția dintre anticorp și antigen (cu cîte o grupare reactivă de fiecare moleculă)
D = reacția dintre antigen și anticorp (cu cîte 2 grupări reactive de fiecare moleculă)
Complexe formate în zona excesului de anticorpi
Complexe formate în zona de echivalență
Complexe formate în zona excesului de antigen

Fig. 83. — Combinarea antigenului cu anticorpul după teoria „rețelei" (Raffel).

tendință pronunțată la unire și deci fără apariția precipitării. Dacă excesul de antigen este mare, structura complexului se prezintă ca în C; ea este spongioasă și precipitarea nu se produce.

Asupra modului de organizare a agregatelor s-au imaginat numeroase scheme, toate plecînd de la conceptul *multivalenței elementelor* care intră în reacție. În stadiul actual al cunoștințelor, pare că imaginea cea mai fidelă a structurii complexelor rezultă din combinarea concepției *multivalenței*, cu cea a *combinării în proporții variabile*.

Reacții de imunitate

Manifestarea reacțiilor antigen-anticorp se face în mod variat, în raport cu natura antigenului și anticorpului respectiv.

Ele stau la baza reacțiilor de imunitate care se execută *in vitro* sau *in vivo* și care sînt larg aplicate atît în diagnosticul serologic al bolilor infecțioase, cît și în terapia specifică a acestora. În afară de natura antigenului și anticorpului, o serie de factori influențează reacțiile antigen-anticorp. Printre aceștia trebuie ținut seama de concentrația în proporții optime a fiecărui component în reacție și de un pH potrivit, combinația antigen-anticorp depinzînd, se pare, de gradul de ionizare a grupurilor carboxilice (Marrack, 1934), concentrația în electroliți și un grad optim de temperatură.

Bordet a arătat că reacția antigen-anticorp are loc în 2 etape: 1) faza de combinare specifică a antigenului cu anticorpul și 2) reacția pusă în evidență prin modificări vizibile — reacția de aglutinare, precipitare, liză, fixare de complement.

Reacția de aglutinare

Punînd în contact *in vitro* un ser imun cu suspensia microbiană corespunzătoare, are loc o reacție antigen-anticorp, manifestată vizibil printr-o reacție de aglutinare în care germenii microbieni sînt îngrămădiți, formînd granule sau flocoane. Reacția de aglutinare a fost descrisă prima oară de Richet și aplicată de Durham și Gruber.

Factorii care influențează reacția de aglutinare. Reacția de aglutinare nu se produce în absența electroliților. Northrop și de Kruif au sugerat că sarea lucrează prin scăderea diferențelor de potențial dintre celulele bacteriene și mediul înconjurător. Totuși, concentrația electroliților nu trebuie să depășească anumite limite, soluțiile prea concentrate exercitînd un efect contrar de împiedicare a aglutinării, prin scăderea forței de coeziune a celulelor sensibilizate.

Concentrația de ser ca și densitatea suspensiei microbiene au de asemenea rol în efectuarea reacției de aglutinare. Duncan a demonstrat că toate aceste trei elemente au un punct de concentrație optimă, care permite sensibilizarea maximă a bacteriilor și cel mai înalt grad de coeziune.

Excesul de anticorpi poate produce o inhibiție a reacției. Fenomenul este cunoscut sub numele de fenomen de zonă. Dacă acest fenomen este observat în tuburile cu concentrații mari de ser la stînga seriei de tuburi în care se constată aglutinare, constitue „fenomenul de prezonă” sau „prozonă”, spre deosebire de absența aglutinării care apare în dreapta seriei de tuburi aglutinate, care este cunoscut ca „fenomenul de postzonă” și care este datorit unei cantități insuficiente de anticorpi necesare producerii aglutinării.

Fenomenul de zonă pare datorit unei substanțe, probabil o globulină, care, adsorbită nespecific pe suprafața bacteriilor, interferează cu reacția dintre antigenul celulelor bacteriene și aglutinina corespunzătoare, reducînd forța de coeziune (Jones și Orcutt). S-a sugerat, de asemenea, că aceste substanțe inhibitoare ar fi anticorpi univalenți capabili să se combine, dar nu să lege celulele.

pH soluției intervine de asemenea în producerea fenomenului de aglutinare. În majoritatea cazurilor, valorile cele mai favorabile de pH sînt acelea între 6 și 9. În soluții acide, pot avea loc aglutinări nespecifice.

Temperatura influențează viteza reacției de aglutinare care crește rapid pînă la 30° apoi mai lent, pentru ca dincolo de 56° reacția să fie jenată, anticorpul începînd să fie afectat.

Agitarea și curenții de convecție în interiorul tubului, mărind contactele între bacterii, favorizează aglutinarea acestora.

Timpul optim de incubare variază în raport cu antigenul folosit.

Aspectul reacției de aglutinare. După cum în reacția de aglutinare sînt interesate antigene flagelare sau antigene somatice, aspectul este diferit, prezentîndu-se sub formă de flocoane ușor disociabile prin agitare în primul caz, de grunji sau granule, în al doilea.

Pijper, folosind metoda cinematografică pe cîmp întunecat, a pus în evidență deosebiri între cele 2 forme de aglutinare. În timp ce în cazul aglutinării flagelare se observă o imobilizare a bacteriilor cu înlănțuirea flagelilor, în cazul aglutinării somatice, germenii se prind prin capetele lor (aglutinare polară).

Mecanismul reacției de aglutinare. Bordet a explicat fenomenul de aglutinare ca fiind un fenomen difazic. În prima fază, aglutinina este adsorbită pe suprafața celulei bacteriene în anumite proporții, datorită unei afinități specifice (fenomenul biologic). În a II-a fază are loc aglutinarea propriu-zisă în prezența electroliților, în raport cu modificările de sarcină electrică și scăderea potențialului germenilor sensibilizați (fenomen fizico-chimic). Această teorie are o serie de lacune, printre care aceea că nu poate explica specificitatea reacției. Marrack și Heidelberger concep mecanismul reacției de aglutinare ca lanțuri formate din molecule bivalente de anticorp care se intercalează și leagă celulele unele de altele.

Tehnica reacției de aglutinare. Reacția de aglutinare se efectuează punînd în contact ser imun în diferite diluții în ser fiziologic, cu suspensia microbiană care constituie antigenul. Reacția de aglutinare poate fi folosită pentru decelarea aglutininelor specifice într-un ser necunoscut, în scop de diagnostic serologic, în care caz se folosesc suspensii antigenice cunoscute sau, dimpotrivă poate fi folosită pentru indentificarea unui germen necunoscut, în care caz se folosesc seruri aglutinante cunoscute.

Serurile aglutinante sînt preparate de obicei pe iepuri, mai rar pe alte animale : capră, oaie etc. Înainte de începerea imunizării, se controlează animalele, alegînd pe acelea care nu au aglutinine naturale corespunzătoare antigenului care va servi pentru imunizare. Ca antigen se folosesc suspensii microbiene vii sau omorîte prin căldură, formol etc., în raport cu caracteristicile antigenului față de care se imunizează animalul.

Suspensia antigenică se administrează în cantități crescînde, în mod repetat, pe cale subcutanată și intravenoasă, la intervale de 4—5 zile.

A 8-a zi de la ultima inoculare se efectuează o sîngerare de probă. Dacă serul arată un titru convenabil față de antigenul omolog, se sîngerează animalul „la alb''. Serul obținut se prezervă cu glicerină (în proporție variabilă în raport cu titrul) și cu fenol 0,5%.

Reacția de aglutinare în tub. Se prepară diluții în ser fiziologic din serul imun, sau serul de cercetat : 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 etc.

Se repartizează cîte 1 ml în tuburi de aglutinare. Din cultură microbiană de 18—20 de ore pe geloză, se efectuează o suspensie groasă în ser fiziologic (aproximativ 2 ml ser fiziologic la un tub de cultură). În fiecare tub cu diluție de ser se adaugă 1—2 picături de suspensie de antigen. În ultimul tub (martor) se pune în contact suspensia microbiană cu 1 ml ser fiziologic. După agitare, tuburile sînt incubate la 37° sau de preferință la 52°, în baie de apă. Aglutinările flagelare sînt citite după incubare de 2 ore, iar cele somatice după incubare de 20 de ore.

Reacția de aglutinare pe lamă se efectuează depunînd pe suprafața unei lame curate o picătură din serul diluat în mod convenabil în ser fiziologic, iar la celălalt capăt al lamei o picătură de ser fiziologic (martor cultură). Cu ansa de platină se ia o mică cantitate de cultură de 18—24 de ore pe geloză. Se depune cultura, alături de fiecare din cele 2 picături. Cu ansa se face în mod treptat amestecul culturii cu serul respectiv, căutînd să se obțină o suspensie omogenă. Se imprimă lamei mișcări de înclinație și se așteaptă 1—2 minute. În cazul corespondenței între antigen și anticorp, apare fenomenul de aglutinare. Cultura nu trebuie să aglutineze cu serul fiziologic. Apariția unui fenomen de aglutinare nespecifică indică degradarea culturii cu trecerea ei în forma „R", caz în care nu se ia în considerare nici aglutinarea obținută în prezența serului imun.

Reacția de adsorbție a aglutinelor. Dată fiind complexitatea structurii antigenice a bacteriilor, serurile preparate prin imunizarea animalelor cu culturi vii conțin mai mulți anticorpi (corespunzători fracțiilor antigenice ale germenilor respectivi). Pentru a obține serul, conținînd aglutininele corespunzătoare numai unei fracțiuni antigenice, denumite seruri *monoreceptoare* sau *seruri de factor*, se îndepărtează celelalte aglutinine prin adsorbție.

Tehnica reacției de adsorbție (Castellani). Se pune în contact o diluție convenabilă de ser (stabilită prin tatonare; de obicei 1/10) cu antigenul adsorbant, constînd fie din culturi vii, fie din culturi încălzite la 100°. Prepararea antigenului se efectuează în raport cu aglutininele care urmează să fie îndepărtate. Cantitatea de germeni folosiți pentru adsorbție se tatonează de asemenea. După contact de 2 ore la 37°, eventual și 20 de ore la 4°, amestecul este centrifugat. Se decantează serul și se testează eficiența adsorbției, prin reacții de aglutinare, atît față de tulpinile adsorbante, cît și față de tulpina posedînd antigene corespunzătoare aglutininei care urma să fie păstrată. Uneori sînt necesare 2—3 adsorbții succesive.

Pentru prezervarea serului adsorbit, se folosește fenol 0,5% sau formol 0,2%.

Reacția de precipitare

În 1897, Krause a arătat că serul animalelor imunizate cu anumite bacterii era capabil să formeze precipitate, cînd era pus în contact cu filtratul culturii în bulion al tulpinii omologe. Reacția era specifică, iar anticorpul respectiv a fost denumit precipitină. Ulterior s-a văzut că seruri precipitante se puteau obține și cu alte substanțe antigenice decît cele bacteriene.

Reacția apare ca manifestare a reacției dintre anticorpul din ser cu antigenul aflat în soluție coloidală. Reacția apare cînd ambele sînt în proporții optime de concentrație și în prezența electroliților. Ca și în cazul reacției de aglutinare, reacția de precipitare este influențată de pH soluției.

Mason a arătat că reacțiile de precipitare au loc între pH 4,5—9,5. În afara acestor limite, precipitatul ar fi dizolvat. Se pare că temperatura intervine, într-o măsură mai redusă, în cazul reacției de precipitare.

În mecanismul reacțiilor de precipitare are loc în prima fază, un fenomen de adsorbție, urmată de condensarea particulelor, în flocoane sau granule, datorită afinității specifice a antigenului și anticorpului, ambii de natură coloidală.

În reacțiile de precipitare se diluează de obicei antigenul. În acest fel, în primele tuburi, acolo unde se găsesc concentrațiile mai mari de antigen anticorpul fiind proporțional insuficient precipitatul nu apare (zonă de inhibiție după Heidelberger).

Precipitatul, în majoritatea cazurilor, conține atît antigen, cît și anticorp cu predominanța celui din urmă, inversul a fost observat numai în cazul antigenelor cu greutate moleculară mare. Boyd și Hooker au atras atenția asupra rolului pe care-l are greutatea moleculară a antigenului în determinarea proporției optime între antigen și anticorp.

Aplicațiile reacției de precipitare sînt multiple. În domeniul medicinei legale, reacția de precipitare este folosită pentru identificarea speciei unui animal, după o pată de sînge (reacția Uhlenhut), pentru această reacție se folosesc seruri precipitante specifice de specie.

În scop de diagnostic : 1) reacția Ascoli, recomandată pentru diagnosticul post-mortem al infecției cărbunoase, se efectuează punînd în contact ser imun anticărbunos cu extract obținut din organele animalului decedat. Apariția unui inel de precipitare indică o reacție pozitivă ; 2) reacțiile de floculare în sifilis ;

— Ca metodă de determinare a structurii antigenice, în vederea identificării serologice a unor germeni microbieni, de exemplu determinarea grupului serologic al streptococilor (metoda Lancefield).

— Ca metodă de titrare *in vitro* a toxinelor și antitoxinelor, prin reacția de floculare.

Tehnica reacției de precipitare. Serurile precipitante se prepară, de obicei, pe iepure, prin inoculări repetate de antigene corespunzătoare.

În cazul serului precipitant anti-om, imunizarea se face cu ser de om în cantități descrescînde de 5, 3 și 1 ml la interval de 4—5 zile. Ultimele două doze trebuie administrate după o prealabilă desensibilizare specifică a animalului și utilizarea substanțelor antihistaminice de sinteză. A 8-a zi de la ultima inoculare se procedează la sîngerarea de probă a animalului. Dacă titrul față de antigenul omolog este corespunzător, se sîngerează animalul „la alb".

Pentru titrarea serului, reacția de precipitare se efectuează în modul următor :

Antigenul este diluat cu ser fiziologic la 1/10 000, 1/20 000, 1/50 000 etc. Se repartizează în tuburi de precipitare cîte 1,9 ml din diluțiile de antigen și 0,1 ml ser precipitant Se fac martori cu 0,9 ml ser fiziologic, precum și cu diferite antigene eterologe. Adăugarea serului imun se face cu pipeta, prelingînd picături de ser pe peretele tubului. Serul se va depune la fundul tubului. Tuburile sînt lăsate în repaus la temperatura camerei și citite din 5 în 5 minute. Cea mai mare diluție de antigen care precipită în prezența serului indică titrul acestuia.

Reacția Uhlenhut. Se suspensionează în ser fiziologic pata de sînge suspectată. Produsul obținut, ca atare și după diluarea lui 1/10, 1/100, 1/1 000, este repartizat în cantitate de 0,9 ml în tuburi de precipitare. Se folosesc ca martori ser normal, aparținînd la diferite specii (om, cal, bou etc.) diluat la 1/100 sau 1/1 000, precum și ser fiziologic, repartizîndu-se din fiecare 0,9 ml în cîte un tub. Cu pipeta se adaugă în toate tuburile ser precipitant anti-om 0,1 ml, lăsînd produsul să se prelingă pe peretele tubului. Tuburile de reacție sînt lăsate în repaus la temperatura camerei și citite după 5—10 minute pe fond negru. Apariția unui inel de precipitare la nivelul de separare între cele 2 lichide indică o reacție pozitivă și arată, în cazul nostru, că pata suspectată era datorită sîngelui de om. Martorul cu sînge de om trebuie să fie pozitiv, în celelalte tuburi martor, lichidul trebuie să rămînă clar.

Reacția de floculare se folosește atît pentru titrarea unei toxine necunoscute în prezența unui ser floculant cu titru cunoscut, cît și pentru titrarea unui ser antitoxic, în prezența unei toxine de valoare cunoscută. Și într-un caz și într-altul, reacția de floculare apare în zona în care ingredientele se găsesc într-o proporție optimă, unul față de altul.

Tehnica reacției de floculare, avînd în toate cazurile un principiu unic, diferă prin mici detalii în raport cu toxina sau serul de titrat.

În cazul titrării toxinei difterice se procedează în modul următor:

Se repartizează în tuburi de hemoliză cantități crescînde (0,1; 0,2; 0,3 ml etc.) de ser antitoxic, conținînd 100 U.A./ml.

Se adaugă în toate tuburile 1 ml toxină de titrat și se completează amestecul cu ser fiziologic pînă la volum de 2 ml.

După agitarea tuburilor și egalarea nivelului amestecurilor, se incubează la baie de apă, la 52°, urmărindu-se apariția floculării prin examinarea reacției din 5 în 5 minute. Cunoscînd că flocularea se produce numai în amestecurile echivalente de toxină-antitoxină și că 1 U.A. este echivalentă la o doză floculantă de toxină Lf. (*limes floculans*), se calculează titrul toxinei în funcție de conținutul în unități antitoxice al primului tub în care a apărut flocularea.

Reacția de precipitare în gel este o metodă de precipitare mai sensibilă decît tehnica descrisă, folosind amestecuri de antigen diluat și ser imun.

Oudin (1946) a propus o metodă constînd din folosirea unui agar care conține cantități convenabile de ser imun, repartizat în tuburi mici, peste care depunea cantități potrivite de antigen. Reacția de precipitare apărea sub forma unor inele în gel, mai mult sau mai puțin nete. Pentru fiecare cuplu antigen-anticorp apare o bandă de precipitat. În 1948, Ouchterlony a recomandat o altă metodă de precipitare în gel, care permite difuzarea atît a antigenului, cît și a anticorpului. Ambele ingrediente sînt depuse într-o serie de godeuri (bazine) efectuate în agar cu ajutorul unor cupe de metal. Antigenul și anticorpul difuzează în gel unul către altul, formînd linii de precipitare în proporții optime acolo unde se întîlnesc.

În cazul mai multor complexe antigen-anticorp, apar mai multe linii de precipitare.

Reacția de precipitare în gel este folosită mai ales pentru studiul structurii antigenice a toxinelor microbiene (exotoxine sau extracte microbiene) ea poate fi folosită și în scop diagnostic.

Reacția de neutralizare toxină-antitoxină

Combinarea toxinei cu antitoxina se realizează în anumite proporții. Un complex toxină-antitoxină, perfect neutralizat, nu mai este toxic. În cursul neutralizării se pare că toxina nu este degradată, ea putînd fi recuperată din amestec, în anumite condiții, prin distrugerea antitoxinei. S-a sugerat că ar fi vorba numai de o acoperire a toxinei cu anticorpul respectiv, punînd-o în imposibilitate de a veni în contact cu țesutul sensibil. Distrugerea toxinei, după unii autori, s-ar putea face lent, sub influența fagocitozei, stimulată de prezența serului imun.

O proprietate importantă a serului antitoxic care ar condiționa în oarecare măsură efectul terapeutic este *aviditatea* (proprietatea care determină viteza de neutralizare a toxinei descrisă de Kraus).

Reacțiile de neutralizare toxină-antitoxină stau la baza titrării serurilor antitoxice și a acțiunii terapeutice a acestora.

Reacția de neutralizare toxină-antitoxină se poate efectua *in vitro* prin reacția de floculare, metoda descrisă de Ramon și *in vivo*, prin metoda descrisă de Ehrlich.

Tehnica reacției de neutralizare toxină-antitoxină in vivo se aplică atît la titrarea toxinelor, cît și a antitoxinelor. În primul caz se folosește un ser cunoscut față de care se titrează toxina supusă examinării în timp ce în al doilea caz, se titrează serul de cercetat, față de o toxină cu activitate cunoscută.

Titrarea ambelor elemente se face în unități.

Se consideră *unitate antitoxică internațională*, U.A.I. sau I.E., cantitatea de antitoxină capabilă să neutralizeze dintr-o toxină proaspătă (săracă în toxoid) 100 D.L.M.

Se consideră că *doza letală minimă a unei toxine* (D.L.M.) constituie cea mai mică cantitate de toxină, capabilă să omoare animalul sensibil de anumită greutate, într-un interval anumit de timp.

Se numește Lo (*limes nul*), cea mai mare cantitate de toxină, care, amestecată cu o unitate antitoxică, nu produce nici o reacție vizibilă, cînd este inoculată la animalul sensibil, de o anumită greutate.

Se numește Lt (*limes tod*), cantitatea cea mai mică de toxină, care, amestecată cu o unitate antitoxică, omoară animalul sensibil de anumită greutate, într-un interval anumit de timp.

Determinarea Lt la toxina difterică. Se efectuează din toxina de titrat o diluție care să conțină pe 1 ml aproximativ 100 D.L.M. Din această diluție se pun în contact cantități crescînde: 1 ml, 1,1 ml, 1,2 ml etc. cu cîte 1 ml ser etalon conținînd 1 U.A. (serul etalon avînd 10 U.A/ml se diluează 1/10). Amestecurile sînt aduse la volum de 4 ml, cu ser fiziologic și lăsate la temperatura camerii 30 de minute. Se inoculează pe cale subcutanată la cobaiul de 250 g un volum de 4 ml. Cobaii

În cazul mai multor complexe antigen-anticorp, apar mai multe linii de precipitare.

Reacția de precipitare în gel este folosită mai ales pentru studiul structurii antigenice a toxinelor microbiene (exotoxine sau extracte microbiene) ea poate fi folosită și în scop diagnostic.

Reacția de neutralizare toxină-antitoxină

Combinarea toxinei cu antitoxina se realizează în anumite proporții. Un complex toxină-antitoxină, perfect neutralizat, nu mai este toxic. În cursul neutralizării se pare că toxina nu este degradată, ea putînd fi recuperată din amestec, în anumite condiții, prin distrugerea antitoxinei. S-a sugerat că ar fi vorba numai de o acoperire a toxinei cu anticorpul respectiv, punînd-o în imposibilitate de a veni în contact cu țesutul sensibil. Distrugerea toxinei, după unii autori, s-ar putea face lent, sub influența fagocitozei, stimulată de prezența serului imun.

O proprietate importantă a serului antitoxic care ar condiționa în oarecare măsură efectul terapeutic este *aviditatea* (proprietatea care determină viteza de neutralizare a toxinei descrisă de Kraus).

Reacțiile de neutralizare toxină-antitoxină stau la baza titrării serurilor antitoxice și a acțiunii terapeutice a acestora.

Reacția de neutralizare toxină-antitoxină se poate efectua *in vitro* prin reacția de floculare, metoda descrisă de Ramon și *in vivo*, prin metoda descrisă de Ehrlich.

Tehnica reacției de neutralizare toxină-antitoxină in vivo se aplică atît la titrarea toxinelor, cît și a antitoxinelor. În primul caz se folosește un ser cunoscut față de care se titrează toxina supusă examinării în timp ce în al doilea caz, se titrează serul de cercetat, față de o toxină cu activitate cunoscută.

Titrarea ambelor elemente se face în unități.

Se consideră *unitate antitoxică internațională*, U.A.I. sau I.E., cantitatea de antitoxină capabilă să neutralizeze dintr-o toxină proaspătă (săracă în toxoid) 100 D.L.M.

Se consideră că *doza letală minimă a unei toxine* (D.L.M.) constituie cea mai mică cantitate de toxină, capabilă să omoare animalul sensibil de anumită greutate, într-un interval anumit de timp.

Se numește Lo (*limes nul*), cea mai mare cantitate de toxină, care, amestecată cu o unitate antitoxică, nu produce nici o reacție vizibilă, cînd este inoculată la animalul sensibil, de o anumită greutate.

Se numește Lt (*limes tod*), cantitatea cea mai mică de toxină, care, amestecată cu o unitate antitoxică, omoară animalul sensibil de anumită greutate, într-un interval anumit de timp.

Determinarea Lt la toxina difterică. Se efectuează din toxina de titrat o diluție care să conțină pe 1 ml aproximativ 100 D.L.M. Din această diluție se pun în contact cantități crescînde: 1 ml, 1,1 ml, 1,2 ml etc. cu cîte 1 ml ser etalon conținînd 1 U.A. (serul etalon avînd 10 U.A/ml se diluează 1/10). Amestecurile sînt aduse la volum de 4 ml, cu ser fiziologic și lăsate la temperatura camerii 30 de minute. Se inoculează pe cale subcutanată la cobaiul de 250 g un volum de 4 ml. Cobaii (cîte 2 pentru fiecare amestec) se urmăresc timp de 4 zile, notînd zilnic reacțiile locale și generale.

Doza Lt este reprezentată prin amestecul care a produs moartea cobaiului în a 4-a zi de la inoculare, cu fenomene de intoxicație difterică.

Titrarea antitoxinei difterice in vivo. Se pune în contact un Lt de toxină cu cîte 1 ml din diferite diluții de ser antidifteric. Alegerea diluțiilor se face în raport cu titrul *in vitro*; se folosesc o diluție inferioară, una corespunzătoare și una superioară. Amestecurile sînt aduse la volum de 4 ml cu ser fiziologic și lăsate 30 de minute la temperatura camerei, după care sînt inoculate pe cale subcutanată la cobai de 250 g. Animalele sînt ținute în observație timp de 4 zile.

U.A.I. este cantitatea de ser care, amestecată cu un Lt de toxină, permite moartea animalului în a 4-a zi de la inoculare, cu leziuni specifice de intoxicație difterică.

Titrarea toxinelor și antitoxinelor tetanice și a altor clostridii se bazează pe aceleași principii, cu unele detalii de tehnică.

Reacția de bacterioliză

După ce o serie de cercetători ca Von Fodor, Nuttal și alții, iar mai tîrziu Buchner (1889) au pus în evidență *alexina* sau *complementul*, substanță responsabilă de efectele bactericide ale serului normal. Pfeiffer și Isaev (1894) au stabilit că inocularea pe cale intraperitoneală de vibrioni holerici la cobaii imunizați specific produce moartea și liza microorganismelor. Același efect l-au obținut acești autori și cînd au injectat intraperitoneal la cobaiul normal un amestec de cultură de vibrion holeric cu ser antiholeric. Fenomenul a fost denumit fenomenul Pfeiffer-Isaev și este strict specific.

Ulterior, Mecinicov a reprodus fenomenul Pfeiffer-Isaev și *in vitro* cu un amestec de cultură, ser imun și exsudat proaspăt de la un cobai normal. Mai tîrziu s-a dovedit însă că serul imun își pierde proprietățile litice, prin încălzire sau învechire. Acțiunea bacteriolitică a acestuia poate fi restabilită însă, prin adăugare de ser proaspăt normal.

Mecanismul reacției. Bordet a dat următoarea explicație fenomenului de bacterioliză: anticorpul specific, termostabil, prezent în serul imun, denumit de Bordet *sensibilizatrice* (de alții bacteriolizină), sensibilizează în mod specific celulele bacteriene. Alexina sau complementul, în faza a II-a a reacției, produce liza elementelor bacteriene sensibilizate.

Tehnica reacției de bacterioliză este redată la capitolul „*Vibionul holeric*".

Reacția de hemoliză

Se bazează pe același principiu și comportă același mecanism de producere ca și reacția de bacterioliză. În 1898, Bordet a dovedit acțiunea hemolitică specifică a serului unui animal imunizat în prealabil prin inoculare repetată cu globule roșii de altă specie animală în prezența alexinei.

Reacția de hemoliză se manifestă prin clarificarea amestecului constituit din suspensie de hematii, ser hemolitic și alexină, care ia o culoare roșie limpede. Lipsa hemolizei cu sedimentarea hematiilor arată o lipsă de concordanță între antigen (hematii) și anticorpii din serul folosit.

Tehnica de preparare a serului hemolitic anti-oaie. Serul hemolitic anti-oaie se prepară prin imunizarea iepurelui de 2 500–3 000 g cu o suspensie de hematii de oaie, spălate.

Sîngele de oaie, recoltat în mod steril din vena jugulară a animalului și defibrinat cu ajutorul perlelor de sticlă, este centrifugat, iar sedimentul, spălat de trei ori cu ser fiziologic, adus la volumul inițial al sîngelui. Se administrează suspensia de hematii de oaie, astfel preparată, pe cale intravenoasă, în doze de 5 ml, 3 ml, 2 ml și 1 ml la 4–5 zile interval. Ultimele 3 inoculări se fac în urma desensibilizării prealabile, folosind dacă este cazul și antihistaminice de sinteză. A 8-a zi de la ultima inoculare se efectuează titrarea de probă a serului. În cazul cînd titrul obținut este de minimum 1/1 000, se sîngerează animalul „la alb''. Dacă titrul este insuficient, se efectuează o inoculare de „rappel'' cu 1 ml suspensie de hematii. Serul obținut este inactivat prin încălzire la 56°, 30 de minute și prezervat cu glicerină.

Titrarea activității serului hemolitic. Se fac diluții din serul de cercetat : 1/100, 1/200, 1/400 pînă la 1/ 5 000. Se repartizează din fiecare diluție, cîte 1 ml în tuburi de hemoliză. Se adaugă apoi cîte 1 ml suspensie de hematii de oaie 5%, în ser fiziologic 8,5‰.

Hematiile sînt în prealabil spălate după tehnica expusă mai sus și sedimentul adus la volumul inițial. Dacă suspensia se face direct din sediment, se folosește concentrația de 1,5%.

Amestecul de ser de cercetat și suspensia de hematii este incubat la 37°, timp de o oră.

Se adaugă apoi două unități de alexină (sub volum de 0,5 ml) și se agită tuburile. Reacția este citită după incubare de 30 de minute la 37°. Diluția primului tub cu hemoliză totală indică titrul serului hemolitic.

Tehnica de obținere și titrare a alexinei este prezentată la capitolul „*Spirochaetales*''.

Reacția de fixare a complementului se bazează tot pe proprietatea alexinei de a fi adsorbită pe complexul antigen-anticorp.

Fixarea alexinei pe antigenul sensibilizat nu poate fi decelată, în măsura în care nu este urmată de un efect litic. Cum majoritatea bacteriilor rezistă la acțiunea litică a alexinei, fixarea acesteia nu poate fi pusă în evidență decît pe cale indirectă, prin metoda descrisă în anul 1901 de către Bordet și Gengou, folosind două sisteme antigen-anticorp.

Modul cel mai convenabil de a face evidentă și a măsura activitatea de fixare a complementului pe primul complex antigen-anticorp, s-a dovedit a fi folosirea sistemului hemolitic.

În aceste condiții, reacția de fixare a complementului comportă două etape : în prima, se pune în contact un antigen cunoscut cu un ser de cercetat și cu o cantitate convenabilă de alexină. Dacă în serul de cercetat există anticorpi specifici față de antigenul folosit, alexina va fi fixată de antigenul sensibilizat specific. În a 2-a etapă, se adaugă al 2-lea sistem, sistemul hemolitic, care este format dintr-un amestec de ser hemolitic anti-oaie cu suspensia de hematii de oaie, păstrat în prealabil la 37° timp de 30–60 de minute pentru sensibilizarea hematiilor. În cazul cînd alexina a fost fixată de primul sistem, hemoliza hematiilor de oaie nu se va produce din cauza lipsei de alexină. Reacția în acest caz este considerată pozitivă.

În cazul invers, cînd antigenul nu corespunde anticorpilor din serul de cercetat, alexina rămîne liberă și va fi fixată de al doilea sistem în care, de această dată va avea loc hemoliza globulelor de oaie. Prezența hemolizei indică o reacție negativă.

Asupra mecanismului avidității pe care complexele antigen-anticorp il arată pentru complement, datele sînt încă neclare.

S-a sugerat că mărimea particulelor, ca și starea fizică a suprafețelor acestora ar putea avea un rol în acest mecanism.

Heidelberger, Weil și Treffers au sugerat că moleculele de complement s-ar combina cu complexele antigen-anticorp, pe cale chimică.

Aplicațiile reacției de fixare a complementului. Reacția de fixare a complementului poate fi efectuată cu orice antigen proteic și este aplicată în scopuri multiple:

—în serodiagnosticul bolilor infecțioase, prin punerea în evidență a anticorpilor fixatori, folosind suspensii antigenice cunoscute;

—pentru indentificarea serologică a germenilor microbieni, folosind seruri specifice.

Tehnica reacției de fixare a complementului este expusă în cadrul reacției Bordet-Wasserman, la capitolul „*Spirochaetales*", iar reacția de fixare a complementului, efectuată după metoda Ida Bengston, la capitolul „*Rickettsiaceae*".

Rolul sistemului nervos în procesul infecțios și imunitate

Prof. N. Nestorescu

Imunologia, știință tînără, face parte din științele naturii. Ea se ocupă cu procesele și relațiile ce se stabilesc între macroorganisme și mediul extern, reprezentat în mod particular, de microorganisme. Pînă la Pavlov, imunologia era preocupată mai ales de studii analitice, ale căror rezultate înfățișau reactivitatea și reacțiile imunologice sub aspectul lor fragmentar, lipsite de o concepție unică și fără să se ocupe îndeajuns de esența și sinteza mecanismelor imunologice. Studii asupra mijloacelor de apărare a organismului erau cunoscute de mult; se cunoșteau o parte din reacțiile și mecanismele fagocitozei, se cerceta imunitatea celulară și umorală, însă ele nu erau totdeauna studiate în procesul integral, evolutiv și real, în așa fel ca să reprezinte expresia legăturilor între macroorganismul luat unitar și mediul din care acesta din urmă face parte.

Cercetările lui Pavlov și ale școlii sale, continuate de către Orbeli. Bîkov și o seamă de alți cercetători sovietici, au deschis orizonturi noi acestei științe. Ei au arătat că organismul animal nu este sub raportul morfogenetic și fiziologic un întreg simplu reprezentînd *însumarea* diferitelor părți ale organismului viu, ci un *ansamblu unitar*, care face parte integrantă din mediu, controlat și coordonat de către un organ central. Organul central care controlează și coordonează relațiile acestui ansamblu este constituit din emisferele cerebrale împreună cu zona subcorticală care posedă ca funcție principală activitatea nervoasă superioară. Cum această activitate prezintă totalitatea manifestărilor fiziologice ale organismului, inclusiv activitatea nervoasă metamerică, era firesc să se includă printre actele fiziologice și reactivitatea imunologică. Marele merit al concepției pavloviene este faptul că pune baze temeinice teoriei fiziologice a procesului infecțios și a imunității, oferind totodată posibilități largi de interpretare fiziologică tuturor aspectelor imunologice.

Într-adevăr, numeroase studii referitoare la imunitate, bazate pe cercetările lui Mecinikov și Pavlov, arată în mod neîndoios că imunitatea trebuie considerată ca un act fiziologic și de adaptare a organismului față de acțiunile nocive ale mediului, agenții de care se ocupă cu precădere, fiind, mai ales, agenții infecțioși.

Model, Zdrodowski și alți cercetători sovietici sînt de părere că, în lumina învățăturii lui Pavlov, este imposibil, în prezent, să se separe legile imunității de legile generale fiziologice. Procesul infecțios și imunitatea, încadrîndu-se sub forma unei totalități de procese fiziologice și de adaptare, este firesc să fie analizate în raport cu sistemul nervos și activitatea nervoasă superioară, care prezidează aceste legi.

Pentru ușoara înțelegere a raporturilor dintre activitatea nervoasă superioară și procesele de imunitate, este necesar să se reamintească unele date foarte sumare privitoare la activitatea nervoasă superioară.

1. Un organism nu poate exista fără legături cu mediul ambiant, legături care se realizează numai cu ajutorul reflexelor. Reflexele pot fi necondiționate sau condiționate.

Reflexele necondiționate se petrec în etajele inferioare ale sistemului nervos și, în opoziție, cu ceea ce se petrece la animale, la om devin dependente de scoarță. Alături de aceste reflexe se mai întîlnesc reflexele condiționate care se dobîndesc în cursul vieții și care au un caracter individual și temporar (se pot stinge).

Reflexele, stînd la baza fiziologică a organismelor, sînt determinate în cazul reflexelor necondiționate, de acțiunea unor excitanți strict specializați, iar în cazul reflexelor condiționate de excitanți foarte diverși; de pildă, antigenele sînt excitanți neobișnuiți, diverși.

2. Pe de altă parte, scoarța cerebrală, reprezentată prin celulele nervoase, prezintă două stări de activitate: excitația și inhibiția. Formarea și stingerea reflexelor condiționate sînt dependente de interacțiunea excitației și inhibiției. Dacă excitația și inhibiția prind deodată numeroase celule, formează centrii corticali, care pot fi, după caz, centrii de excitație sau inhibiție.

Inhibiția, după Pavlov, trebuie considerată ca un proces de activitate și nu de oboseală; inhibiția este de două feluri: supraliminală, datorită unui excitant de mare intensitate și inhibiția negativă, datorită acțiunii unei excitații. Ambele feluri de inhibiție joacă un rol foarte important în imunitate.

Excitația și inhibiția, fiind procese active, se poate în acest caz vorbi și de o dinamică corticală. Dinamica corticală este datorită particularităților de iradiere, generalizare, concentrare și inducție reciprocă a acelor stări de activitate, care se interferează.

În raport cu individul, în scoarța cerebrală apar centre de excitație și inhibiție care formează reflexe condiționate. Dacă ordinea în secvența excitanților de mediu se păstrează un timp mai îndelungat, se realizează o anumită dispoziție a centrilor corticali, care funcționează totdeauna într-un anumit fel și care a luat denumirea de stereotip dinamic (Bîkov). Și dinamica corticală explică numeroase fenomene de imunitate.

I. Rolul sistemului nervos în patogeneza bolilor infecțioase

După Speranski și elevii săi Cirkovski, Pigalev, Pletițîi, Alimov etc., rolul sistemului nervos în patogeneza bolilor infecțioase este singurul dominant. După acești cercetători, agentul infecțios, care constituie un excitant neobișnuit, nu face altceva decît amorsează o serie de procese biologice în lanț, boala fiind, după acești autori, o succesiune de relații noi, care se stabilesc între țesuturi și sistemul nervos. În esență, concepția patogenetică a lui Speranski admite că procesul infecțios este specific numai în stadiul de început al bolii, manifestările ulterioare ne mai fiind legate de agentul patogen, declanșator al bolii. Manolov, verificînd prin numeroase experiențe rolul procesului neurodistrofic în procesul infecțios, care constituie o a doua categorie de fenomene legată de distrofia nervoasă, provocată de excitația nervoasă, prin prezența agentului invadant, nu a confirmat rezultatele experimentale ale lui Speranski și școala sa, decît în foarte rare cazuri.

Fără îndoială, așa cum alți autori s-au exprimat, o boală infecțioasă cauzată de un agent microbian care este sensibil la un antibiotic oarecare, se vindecă o dată cu sterilizarea bacteriologică, fără să mai urmeze o serie de procese consecutive care să întrețină aspectele clinice de boală. Pe de altă parte, Zilber, spre pildă, plecînd de la constatarea că specificitatea unei boli infecțioase poate fi dovedită, atît în cursul evoluției sale, cît și multă vreme după vindecarea clinică și bacteriologică (uneori ani de zile), nu se alătură ipotezei lui Speranski.

II. *Rolul sistemului nervos în rezistența naturală (imunitatea naturală)*

După cum s-a arătat, bazele imunității naturale sînt legate de factori celulari și umorali, însoțiți de o serie de modificări metabolice caracteristice.

Încă din 1929, Rosenow și mai tîrziu Beer arătaseră existența unor centri nervoși superiori, localizați în corpul striat, talamus și regiunea hipotalamică, care stimulează organele hematopoietice, favorizînd formarea celulelor din seria mieloidă.

Pe de altă parte, Hoff, folosindu-se de insuflația ventriculilor cerebrali, obține leucocitoza neutrofilă cu devierea spre stînga a tabloului.

Existența unei formații nervoase care reglementează activitatea sistemului leucocitar a putut fi demonstrată cu succes în țara noastră de către Benetato, Oprișiu și Baciu. Acești autori, folosind metoda „capului izolat", care asigură circulația somatocefalică cu menținerea anatomică și funcțională a măduvei spinării cu toate căile corticosomatice și hipotalamico-viscerale, au arătat că apariția leucocitozei și a unei limfopenii relative, care la animalele imunizate cu *S. typhimurium* este mult crescută, este puternic scăzută, sau chiar inhibată, prin blocarea centrilor diencefalici.

Pe de altă parte, Benetato și colaboratorii, excitînd regiunea hipotalamică cu un curent faradic, au arătat că reacția fagocitară a cîștigat în intensitate, la fel ca cea obținută prin introducerea antigenului specific.

De la acești centri, influxul nervos leucostimulator coboară prin măduva spinării și centrii organovegetativi pînă la organele intermediare (ficat și glandă suprarenală), care, la rîndul lor, acționează asupra organelor hematopoietice. Transmiterea stimulului nervos prin măduva spinării a fost demonstrată de Linhard și Benetato prin secționarea măduvei, care duce la suprimarea leucocitozei. Gottsegen pe de o parte și Benetato pe de alta au opinat că excitarea hipotalamusului se traduce prin formarea, la nivelul ficatului sau splinei, a unei substanțe, denumită leucopoietină sau neutrofilină, care ar acţiona pe cale umorală asupra organelor leucoformatoare.

O altă serie de cercetări (Titova, Pucikov etc.) atribuie un rol foarte important mediatorilor chimici asupra leucocitelor. Aceste substanţe eliberate în sînge şi puse în contact cu leucocitele le prepară în vederea fagocitozei.

Un rol important al activităţii nervoase superioare asupra reglării fagocitozei prin mecanismul reflexelor condiţionate a fost demonstrat în 1926 de către Metalnikov, iar în ţara noastră, în 1929, de către Nicolau şi Antinescu-Dimitriu.

Metalnikov introducea diverşi germeni (stafilococi, *B. anthracis*) la cobai, pe cale intraperitoneală, însoţind fiecare inoculare de o excitaţie externă (frecarea pielii sau aplicarea pe o regiune a animalului, a unei plăci calde). Ulterior, excitaţia externă era aplicată fără inocularea de antigen şi se constata că aceste animale rezistă la infecţia consecutivă cu germeni vii, pe cînd animalele martor, care nu primiseră şi excitaţia externă, sucombau în cursul primelor 6 ore de la infecţia secundară. Excitaţia externă repetată singură, după un număr de inoculări antigenice, însoţite de excitaţia externă, avea acelaşi efect ca şi introducerea antigenului (aflux de polimorfonucleare şi monocite, creştere de anticorpi specifici).

În urma acestor experienţe, Metalnikov conchidea că „bolile cronice şi nervoase, accesele şi paroxismele se produc sub influenţa excitanţilor, care n-au nimic comun cu cauza esenţială a bolii". După acest autor, suprimarea excitanţilor condiţionali ar fi suficientă pentru a produce un efect salutar asupra bolnavului.

Cercetările lui Metalnikov au fost confirmate de Vîgodcikov, Barîkina şi alţii.

Reglarea factorilor umorali ai rezistenţei naturale a fost studiată în 1953 de către Gasanov. Acest cercetător a demonstrat că secreţia de lizozim poate fi legată de un mecanism reflex al secreţiei, diferit de acela al secreţiei salivare.

III. Rolul sistemului nervos în imunitatea dobîndită

Importanţa reflexului condiţionat, ca mecanism al apariţiei anticorpilor, a fost arătată încă din 1926 de către Metalnikov, deşi lucrările sale în această privinţă nu au fost confirmate de toţi cercetătorii care au încercat să refacă experienţele sale. Rînd pe rînd, Ramon, Friedberger şi Gurwitz, Ostrovskaia etc., verificînd lucrările lui Metalnikov privitoare la acumularea de anticorpi prin excitaţie condiţionată, obţin rezultate contradictorii, neizbutind să pună în evidenţă rolul reflexelor condiţionate în formarea anticorpilor.

Dimpotrivă, alţi autori ca Lebedinski şi Vîgodcikov, şi în special Dolin şi Krilov, au obţinut stimulare de anticorpi. În ţara noastră, Donovan, Marcella Popovici şi colaboratorii au constatat uneori o creştere de anticorpi pe un lot mare de animale, dar această creştere nu confirmă rezultatele aşa de ferme pe care le-au publicat Dolin şi colaboratorii.

Pornind de la rezultatele pozitive ale rolului reflexelor condiţionate în procesul de imunitate, Kopelova, Kopelov şi Posselt într-o serie de lucrări au studiat pe om rolul reflexelor condiționate în imunizare. Acești autori imunizau diferite persoane cu doze mici de vaccin tific, aplicînd — o dată cu fiecare inoculare — o bucățică de gheață pe limba acestora. După 21 de zile de la terminarea vaccinării, autorii au aplicat numai gheața, neînsoțită de inocularea concomitentă de vaccin și au constatat o creștere apreciabilă, dar de scurtă durată, de aglutinine antitifice. Apariția acestor fenomene nu era întîlnită însă la toate persoanele supuse experienței. În alte experiențe, Kopelova și colaboratorii au schimbat excitantul și locul de aplicare al acestuia și rezultatele au fost de această dată cu totul diferite. Din această cauză, autorii au tras concluzia că rolul reflexelor condiționate în imunitate este limitat de alegerea excitantului condiționat și de receptivitatea individuală a fiecărei persoane în parte, față de excitantul respectiv.

Într-adevăr, reactivitatea imunologică a organismului este în funcție de o serie întreagă de factori, printre care, vîrsta, starea fiziologică de inhibiție (hibernare), alimentația, factori ai mediului extern etc., care se adaugă la factorul individualitate imunologică. De aceea, printre oameni și animale se întîlnesc indivizi inerți sau refractari la anumiți excitanți condiționali.

Rezultatele așa de contradictorii asupra mecanismului de apariție a anticorpilor par mai curînd legate de particularitățile pe care le întîlnim în acțiunea antigenelor asupra excitabilității receptorilor, care pot duce la o intensificare a mijloacelor nespecifice de apărare a organismului.

Se știe că o substanță care pătrunde în umorile organismului, tulburînd constanța sa, provoacă o serie de reflexe. Reflexele provocate de antigene au fost amănuțit studiate de către Ado, și publicate în monografia sa.

În cercetările sale, Ado, folosind pe de o parte sinusul carotidian ca loc al receptorilor chemați să intervină în modificările circulației sanguine sau ale respirației, iar pe de alta, antigene diferite (toxine proteice sau endotoxine), demonstrează că substanțele antigenice nu au decît o slabă capacitate de a excita receptorii zonelor vasculare reflexogene, însă pot modifica excitabilitatea acestora. Ado leagă de creșterea excitabilității, provocate de imunizare, apariția reflexelor vasomotoare, respiratorii și secretoare, care se adaugă la intensificarea mecanismelor de apărare a organismelor.

După acest autor, imunitatea prezentînd aspecte de fiziopatologie ar trebui să se cunoască mai bine ce revine acestora din desfășurarea proceselor fiziopatologice.

În afară de aspectele și mecanismele imunologice arătate mai sus, supuse legilor cu aspect general, procesele de imunogeneză, în raport cu rolul activității nervoase superioare, se conduc și după o serie de legi specifice.

Una dintre aceste legi este cunoscută sub numele de legea intervalelor, bine studiate de Zdrodovski. Acest autor a arătat, printre altele, că o imunizare eficace a unui animal este legată de stimuli imunizotori care trebuie repetați la intervale anumite.

Această lege pare să fie de fapt un reflex condiționat de timp, asemănător reflexelor condiționate ale omului, cum este trezirea din somn la o anumită oră sau senzaţie de foame, la intervale anumite (mai ales la sugar).

O altă lege care dirijează procesele imunologice este legea succesiunii celor două aspecte fundamentale ale activităţii celulelor nervoase, excitaţia şi inhibiţia, însoţite de fazele lor de tranziţie.

Zdrodovski arată că, în cursul procesului de formare a antitoxinelor, după un nivel de reactivare maxim, urmează totdeauna o fază refractară, în cursul căruia capacitatea animalelor de a produce anticorpi scade sau chiar dispare. Acest fenomen s-ar explica în felul următor: excitantul (antigenul), fie că este prea puternic, fie că starea de excitaţie este prea prelungită, determină în jurul focarului centrului de excitaţie focare de inhibiţie, prin inducţie reciprocă. Această stare de inhibiţie ar cuprinde pînă la urmă şi centrul excitantului condiţional, care, fiind inhibat, nu mai poate declanşa reflexul condiţionat. În acest caz, animalul rămîne în repaus un tip oarecare, după care centrul excitantului condiţional iese de sub înrîurirea focarului de inhibiţie.

În fine, o a treia lege specială, care pare să dirijeze procesele imunologice, este legea „însumării excitaţiilor". În cursul procesului de imunizare, primele două excitaţii imunizatoare scot organismul din starea sa de inerţie; aceste prime excitaţii imunizatoare formează aşa-numita imunizare primară sau pregătitoare. Excitaţiile imunizatoare care urmează, fiind efectuate pe un organism modificat din punct de vedere reactiv, formează imunizarea cunoscută sub numele de revaccinare. Aceste excitaţii imunizatoare ale revaccinării. Aceste excitaţii munizatoare ale revaccinarii sînt supuse fenomenului de însumare şi conduc la creşterea progresivă a reactivităţii imunologice a organismului.

Însumarea excitaţiilor imunizatoare merge pînă la o limită, după care apar focare de inhibiţie de aspect supraliminal, care nu permite creşterea anticorpilor în continuare. Este ştiut că există o anumită proporţionalitate între intensitatea excitantului condiţional şi intensitatea reflexului condiţionat pe care îl determină.

Cînd intensitatea excitantului direct sau însumat trece de o anumită valoare, reflexul scade şi chiar încetează, fenomenul fiind un mijloc de apărare a celulelor nervoase faţă de acţiunile prea puternice care vin din mediul exterior. Acest mecanism explică legea pragului în imunologie. Se cunoaşte areactivitatea sau reactivitatea scăzută a animalelor în imunizare, cînd sînt inoculate cu cantităţi prea mari de antigen sau cînd cantităţi tolerate sînt inoculate la intervale prea mici. Metoda preconizată de unii autori, care inoculează, zilnic, antigene, în vederea obţinerii într-un timp scurt a unei mari cantităţi de anticorpi, nu s-a impus ca o metodă practică la prepararea serurilor aglutinante, precipitante sau hiperimune.

*

Datele arătate mai sus, deşi interpretate diferit de numeroşi imunologi, unii dintre ei mai puţin înclinaţi să admită un rol aşa de important şi variat sistemului nervos central, dovedesc totuşi, neîndoios, că activitatea nervoasă superioară deţine un rol important în coordonarea proceselor imunologice.

Cel puţin în procesele imunităţii naturale, fie că acestea sînt legate de factorii celulari sau de cei umorali, majoritatea autorilor nu mai pun la îndoială rolul coordonator şi stimulator al sistemului nervos; dimpotrivă, în ceea ce priveşte intervenţia sistemului nervos în apariţia anticorpilor, părerile autorilor sînt cu totul împărţite. Dacă se ţine seamă că procesele existente în imunitatea cîştigată sînt legate de factori care privesc numai viaţa individuală a oamenilor şi animalelor, cu alte cuvinte au numai o evoluţie ontogenică şi dacă se ţine seamă că, în procesele imunităţii naturale, factorii care stau la baza ei au o evoluţie de multe secole care au îngăduit fixarea lor, se poate avea o explicaţie pentru ce desfăşurarea fenomenelor imunologice respective se face diferit, prin mecanisme diferite. (Zilber).

Fenomenele de sensibilizare imuno-biologică: anafilaxia şi alergia

Dr. C. C. Oprescu

O dată introduse în organism, unele antigene (de pildă toxinele microbiene) exercită o acţiune nocivă asupra acestuia, mergînd uneori pînă la moartea lui. Altele însă (de exemplu proteinele banale, polizaharizii bacterieni liberi ş.a.) rămîn fără efect asupra organismului cu care vin pentru prima oară în contact. Deşi inofensive la o primă injectare, şi acestea din urmă pot deveni mai mult sau mai puţin nocive în anumite condiţii, atunci cînd sînt introduse într-un organism cu care au mai venit, anterior, în contact. În acest caz, totul se petrece ca şi cum organismul, preparat printr-un prim contact cu antigenul, devine sensibilizat faţă de un nou contact cu acelaşi antigen.

Asemenea fenomene de *sensibilizare* a organismului faţă de antigene au fost semnalate şi studiate pentru prima oară de Richet şi Portier (1902). Cercetînd acţiunea imunizantă a unor extracte din tentaculele de actinii şi din corpul unor midii asupra cîinelui (actinocongestina şi mitilocongestina), ei au constatat că animalele care supravieţuiseră unei prime injecţii cu aceste extracte au prezentat accidente aproape imediate (vărsături, diaree sanguinolentă, dispnee, însoţite de hipotensiune marcată, depresiune nervoasă şi uneori moarte), atunci cînd li se reinjecta intravenos — după 2—3 săptămîni — o doză mult mai mică din acelaşi extract. Simptomele declanşate la animal după cea de-a doua injectare, *injecţia declanşantă*, diferă total de cele observate cu ocazia primei injecţii, *injecţia preparantă* cînd, fie că nu se remarcă nimic anormal dacă animalul primise un antigen banal (de exemplu ovalbumină), fie că apar simptome progresive de intoxicaţie evoluînd timp de cîteva zile, dacă antigenul era reprezentat de o toxină microbiană (toxicitate primară). Dar chiar şi în acest din urmă caz simptomele pot fi foarte atenuate, ori lipsesc cu desăvîrşire, dacă doza de toxină a fost suficient de mică sau administrată treptat, animalul răspunzînd la injectarea ei prin elaborare de antitoxină în ser (imunizare).

Cu toate că simptomele apărute în urma injecţiei declanşante diferă atît de mult de cele constatate după injecţia preparantă, Richet şi Portier au considerat cele constatate ca opuse imunităţii (= filaxiei), şi au denumit fenomenul anafilaxie (ceea ce înseamnează : opus filaxiei sau protecţiei).

Totalitatea fenomenelor care apar imediat după injecţia declanşantă, în mod mai mult sau mai puţin brutal, cu siderarea sistemului nervos, constituie şocul anafilactic (Besredka) şi trădează starea de hipersensibilitate dobîndită de organism. Şocul se poate manifesta foarte discret, reducîndu-se la cobai la simple mîncărimi ale nasului cu strănut, tresăriri (secuse), zburlirea părului, anxietate etc., sau poate deveni din ce în ce mai sever, cu dispnee accentuată, prostraţie, cădere pe flancuri, comă şi moarte. Succesiunea simptomelor şi moartea survin foarte repede (în cîteva minute). Dacă animalul supravieţuieşte şocului, revenirea lui la normal este foarte rapidă şi completă. La necropsia animalelor moarte prin şoc, se constată în general, la deschiderea cutiei toracice, o distensie importantă a bronhiolelor prin contracţia musculaturii lor netede (cobai), precum şi alte fenomene caracteristice, variind cu specia animală : constricţia venelor suprahepatice, congestia intensă a sistemului port hepatic cu hemoragii masive gastro-intestinale (mucoasă hemoragică), zone hemoragice pleuro-pulmonare (cîine). În aceste cazuri, moartea survine prin tulburări vasomotorii brutale.

În esenţă, şocul anafilactic este produs de două cauze principale : 1. *contracţia musculaturii netede* şi 2. *creşterea permeabilităţii vasculare.* El este însoţit şi de alte manifestări caracteristice : *edem, scăderea coagulabilităţii sîngelui* (eliberare de heparină), *hipotensiune* (prin dilatarea capilarelor), *hipotermie, trombocitopenie, leucopenie* cu aglutinarea leucocitelor în teritoriile pulmonare şi eozinofilie marcată, ceva mai tardiv, la acelaşi nivel. Simptomele variază cu specia animală, fiecare specie reacţionînd printr-un anume organ de şoc, la nivelul căruia fenomenele anafilactice sînt mai acute : plămînul la cobai, tractul gastro-intestinal la iepure, cîine, pisică, cal, oaie etc. Deosebirile provin, pe de o parte, din distribuţia diferită a musculaturii netede în diferite organe, iar pe de alta, din sensibilizarea variabilă în cuprinsul aceluiaşi organ, ori din diferenţele procentului de histamină elaborată, ca şi bogăţiei în vase senzitive.

Mecanismul instalarii hipersensibilităţii anafilactice este astăzi bine cunoscut : el este rezultatul unor reacţii antigen-anticorp *in vivo*.

Antigenele sînt reprezentate de substanţele sensibilizante, de cele mai multe ori de natură proteică sau din grupa glucidelor. Aceste antigene sensibilizante se mai numesc şi *anafilactogene.* Ele pot conferi starea de sensibilizare, pe toate căile de administrare, şi în doze variabile. Astfel, cobaiul poate fi sensibilizat specific, cu o doză de 10^{-6} ml ser de cal (corespunzînd la 7×10^{-8} g proteină), sau cu o doză de 5×10^{-8} g ovalbumină etc. Experimental, calea de acces a anafilactogenelor în organism este cea *parenterală* (intravenoasă sau subcutanată), dar observaţiile clinice arată că şi cea *digestivă* poate fi, uneori, eficientă.

Anticorpii umorali au un rol indispensabil, atestat de fapte neîndoielnice între care :

1. Substanţele anafilactizante sînt totdeauna antigenice ; injectarea lor determină o sensibilizare strict specifică ; specificitatea anafilactică este doar o consecinţă a specificităţii anticorpilor anafilactizanţi.

2. *Perioada de inducere* (incubaţia) a stării de hipersensibilizare anafilactică este de aproximativ 10 zile, ceea ce corespunde întocmai cu

timpul necesar pentru apariția anticorpilor specifici în ser, după injectarea antigenului.

3. Starea de sensibilizare anafilactică poate fi *transmisă pasiv* (prin injectarea serului provenit de la organismul sensibilizat), la un organism „nou''. Transmiterea pasivă nu reușește dacă serul donatorului a fost lipsit de anticorpi, prin contact prealabil cu antigenul sensibilizant.

Anafilaxia *pasivă* diferă de cea *activă*, prin instalarea ei imediată și durata scurtă (aproximativ 2 săptămîni).

4. *Specificitatea* reacțiilor anafilactice este întru totul analogă celei a tuturor reacțiilor serologice.

5. *Prezența anticorpilor specifici* în serul organismului sensibilizat poate fi pusă în evidență prin tehnici apropiate (metoda Cannon-Marshall).

6. Capacitatea serului de a conferi pasiv starea de anafilaxie este proporțională cu titrul *precipitinelor* din ser. Această constatare sugerează o identitate între anticorpii precipitanți și cei sensibilizanți, care însă nu este acceptată de toți autorii.

Dacă rolul anticorpilor în inducerea sensibilizării anafilactice, ca și natura șocului ca rezultantă a unei reacții antigen-anticorp, sînt bine precizate, asupra locului în care se produce fenomenul există două ipoteze care încearcă să-l precizeze, și anume :

a) **Teoria celulară** (Besredka), care consideră că unirea antigenului cu anticorpul nu declanșează șocul decît dacă se produce în intimitatea celulelor. Ea se sprijină pe reacția Schultz-Dale : dacă se pune într-o baie cu soluție Ringer, o ansă intestinală sau un fragment de corn uterin, prelevate de la un animal (de pildă cobai) sensibilizat față de un anumit antigen (de exemplu ser de cal, ovalbumină etc.), acestea se contractă puternic deîndată ce se adaugă în baie antigenul respectiv (omolog). La aceasta, s-a obiectat că fragmentele de organ ar fi putut totuși cuprinde, în limfa intercelulară, urme de anticorpi. Un alt argument este că instalarea anafilaxiei pasive necesită o perioadă de incubație — de cel puțin cîteva ore — care este interpretată ca necesară pentru fixarea anticorpilor de celule. Dar și la aceasta s-a obiectat că dacă lucrurile se petrec astfel la cobai, ele nu se verifică la iepure sau la cîine, la care fenomenele anafilactice se produc și la injectarea simultană a antigenului și anticorpului, ori chiar a precipitatului rezultat *in vitro* din contactul lor. Totodată, există și posibilitatea provocării unei anafilaxii inverse, constînd din injectarea prealabilă a anticorpului și ulterior a antigenului corespunzător (Opie și Furth). În ce privește perioada de incubație, aceasta poate lipsi chiar și la cobai, în anumite cazuri (seruri străine).

b) **Teoria umorală** (Richet) se bizuie pe apariția, în cursul șocului, a unor substanțe toxice speciale : anafilatoxinele (Friedberger). Acestea se obțin dacă se pune în contact un ser normal proaspăt, cu un complex antigen-anticorp (precipitat specific, sau hematii sensibilizate), care se îndepărtează apoi prin centrifugare. Serul astfel debarasat, injectat pe cale intravenoasă la animalul nou, declanșează fenomenele caracteristice șocului : *in vitro* serul a devenit *anafilatoxic* (Friedeman, Friedberger). Fenomenul nu apare dacă serul este încălzit la 56°, ceea ce atestă rolul probabil al *alexinei* în producerea lui. Bordet a arătat că unele substanțe, fără legătură cu complexul antigen-anticorp, dar care pot adsorbi alexina (de exemplu geloza), pot transforma un ser proaspăt în anafilatoxină. Pentru aceasta, este suficient să se adauge unui ser proaspăt de cobai urme de geloză în ser fiziologic, iar amestecul incubat şi centrifugat: supernatantul rezultat, injectat intravenos la cobai, declanşează un şoc anafilactic tipic. Toate anafilatoxinele pot declanşa accidente anafilactice nu numai *in vivo*, ci şi *in vitro*, aşa cum se poate demonstra prin metoda Schultz-Dale. În ce priveşte natura şi modul de acţiune a anafilatoxinelor, ele s-ar explica prin proprietăţile complexelor opsonizate pe care le coţin, care se absorb masiv pe celulele endoteliilor vasculare (Bordet, Nolf şi Adant).

In clinică sînt bine cunoscute fenomenele anafilactice caracteristice accidentelor serice, care apar după injectarea de seruri terapeutice. Reinjectarea de ser la un individ care mai primise anterior injecţii din acelaşi ser determină apariţia, rapidă şi violentă, de simptome caracteristice şocului anafilactic acut, cu aspect sincopal. Dacă prima injecţie de ser se face unui receptor nou (care nu mai primise anterior ser), fenomenele apar într-o anumită proporţie din cazuri şi cu întîrziere (după 10–12 zile); simptomatologia este şi ea mai atenuată (angioedeme, mialgii, artralgii, limfadenopatii, febră, tuse, anxietate). Această „*boală a serului*" a fost atribuită de Pirquet şi Schick întîlnirii *in vivo* dintre antigenul persistent în organism, şi anticorpul pe cale de formare. Perioada ei de incubaţie corespunde întocmai duratei necesare, elaborării anticorpilor serici. Boala poate fi reprodusă la animal (cobai, iepure) printr-o singură injecţie a unei cantităţi relativ mari de ser heterolog. La *om*, ea poate fi transmisă pasiv: dacă se injectează unui individ normal, pe cale subcutanată, un ser heterolog (de pildă ser de cal), şi după cîteva ore i se injectează intravenos ser de convalescent de la o persoană care a făcut boala serului, la locul injecţiei subcutanate apare o reacţie locală caracteristică (Voss). Dacă între cele două injecţii se lasă un interval de timp de cîteva zile, se obţine o reacţie caracterizată printr-o erupţie generalizată, întocmai ca cea din boala serului. Cu toată simptomatologia ei violentă, boala serică este o afecţiune benignă şi de durată scurtă.

Etiologia accidentelor anafilactice nu este însă precis cunoscută. Unii le consideră ca rezultînd dintr-o rupere a echilibrului coloidal al plasmei sau al citoplasmei celulare, în momentul unirii antigenului cu anticorpul, interferînd cu fiziologia normală a ţesuturilor afectate. Alţii incriminează elaborarea unei substanţe toxice chiar în intimitatea ţesuturilor. Astfel, la cîine, s-a constatat că în timpul şocului ficatul eliberează realmente o asemenea substanţă; scoţînd acest organ din circulaţie, substanţa nu mai poate fi pusă în evidenţă, iar şocul poate fi astfel prevenit. Dacă ficatul sensibilizat este transplantat unui animal nou, şocul poate fi imediat declanşat prin injecţia de antigen. S-a presupus (Lewis, Abel şi Subota) că substanţa toxică responsabilă ar fi histamina sau o substanţă analogă acesteia: substanţa „H", o componentă normală a sîngelui şi ţesuturilor, în care se află legată de proteine şi lipide. Complexele antigen-anticorp ar determina ruptura acestei legături cu eliberarea histaminei, aşa încît şocul anafilactic reprezintă, de fapt, un şoc histaminic. Proprietăţile farmacodinamice ale substanţei concordă cu această ipoteză: injectarea ei pe cale intradermică provoacă apariţia triadei Lewis (vasodilataţie paralitică centrală, zonă papuloasă de edem urticarian, areolă eritematoasă de vasodilatație activă, printr-un reflex de axon). Aceste efecte sînt datorite proprietății histaminei de a determina creșterea permeabilității vasculare și contracția musculaturii netede, fenomenele esențiale ale anafilaxiei. Eliberarea histaminei din țesuturi (ficat), sau din celulele sanguine (leucocite), se însoțește de elaborarea unei enzime proteolitice, sau a unei liolecitinaze, activate de reacția antigen-anticorp. Aceste enzime rup legătura histaminei cu constituenții celulari proteici (arginină sau lizină), sau cu cei lipidici, la nivelul radicalului iminic (= NH) sau imidazolic. Acțiunea toxică pare a se datori prezenței radicalului amino ($-NH_2$).

Identificarea histaminei și a substanțelor H înrudite cu ea, cu factorul responsabil de producerea șocului anafilactic — deși încă incertă — este atestată și de alte probe experimentale :

a) susceptibilitatea unor specii la șocul anafilactic este paralelă cu sensibilitatea lor la intoxicația cu histamină ;

b) animalele la care se obține, prin tratament, o toleranță mărită față de histamină, devin și mai rezistente la anafilaxie ;

c) țesuturile care participă cel mai intens la șocul anafilactic sînt și cele mai sensibile la acțiunea histaminei ;

d) substanțele antihistaminice de sinteză (fenerganul, benadrilul, piribenzamina etc.), care sînt inhibitori competitivi ai histaminei, posedă și o acțiune preventivă marcată a accidentelor anafilactice (datorită, în special, acțiunii lor asupra permeabilității capilare) ;

e) substanțe foarte asemănătoare histaminei au fost găsite în circulația animalelor în stare de șoc anafilactic.

Concepția histaminică a anafilaxiei este însă în discordanță cu unele fapte importante, ca de pildă :

— șocul anafilactic se însoțește de o scădere a coagulabilității sîngelui, care nu se constată în șocul histaminic (liberare concomitentă de heparină ?) ;

— nu se poate obține o desensibilizare anafilactică prin intermediul histaminei ;

— la unele specii animale (cal, iepure, vițel) se constată, în timpul șocului, o scădere a histaminei sanguine etc.

De aceea s-a admis recent (Went, 1940) că în anafilaxie intervin — la nivelul diferitelor țesuturi — substanțe anafilactogene diferite : histamina în ficat și plămîn, colina în inimă, adrenalina în capsulele suprarenale etc. Astfel, Danielopolu a arătat că orice antigen introdus în organism determină o liberare de acetilcolină ; în timpul șocului, această substanță este eliberată — sub acțiunea complexului antigen-anticorp-alexină —, pe seama unei precoline existente în celulele inervate de sistemul nervos vegetativ din care antigenele venite în contact cu celulele produc elaborarea acetilcolinei libere. De aici rezultă și marea importanță a sistemului nervos vegetativ (SNV) în producerea fenomenelor anafilactice.

Sensibilitatea anafilactică o dată dobîndită, nu este ireversibilă, ea putînd fi făcută să dispară, prin injectarea repetată și în doze mici, fracționate, a antigenului : este metoda clasică de desensibilizare Besredka. Desensibilizarea astfel obținută este însă temporară (aproximativ 2 săptămîni la cobai, cîteva zile la iepure etc.). *Perioada refractară* caracteristică desensibilizării s-ar datori saturării anticorpilor sensibilizați de către antigen așa încît o supraadăugare a acestuia rămîne fără efect. Dacă animalul sensibilizat primeşte pe cale venoasă o cantitate suplimentară de anticorpi, el poate fi astfel protejat faţă de o doză letală de antigen: *antianafilaxie* (Weil). După unii (Bronfenbrenner), fenomenul de desensibilizare ar fi datorit unei interferări temporare cu enzimele proteolitice responsabile pentru eliberarea histaminei din ţesuturi.

În mod practic, punerea în evidenţă a sensibilizării anafilactice se face prin metodele biologice, între care testele cutanate cu antigene sînt de uz curent. Testarea se practică pe cale percutanată sau intradermică. Reacţiile pozitive apar sub forma unui eritem local la locul testării (lectură precoce).

Tipurile de sensibilizare imediată

După anumite caractere particulare pe care le poate prezenta, hipersensibilizarea de tip imediat se poate prezenta sub 4 forme distincte de manifestare, după cum urmează:

1. *Anafilaxia propriu-zisă* cu caractere specifice arătate mai sus, este prototipul sensibilizării de tip imediat.

2. *Fenomenul Arthus*, care constituie expresia unei anafilaxii locale. Este provocat prin injectarea repetată, de preferinţă într-o aceeaşi regiune, la interval de cîteva zile, a unui aceluiaşi antigen, administrat subcutanat sau intradermic. Prima injecţie rămîne fără efect, sau se reduce la o reacţie minimă şi fugace. Începînd cu injecţia următoare însă, reacţia locală devine din ce în ce mai intensă, caracterizîndu-se la început printr-un edem cu infiltraţie tot mai pronunţată, apărînd la cîteva ore de la reinjecţie, şi care evoluează spre formarea unui abces steril. Reacţia se datoreşte combinării directe dintre anticorpii precipitanţi şi antigen *in situ*, în concentraţii adecvate, cu participarea vaselor sanguine din teritoriul afectat. Ea are loc deîndată ce antigenul vine în contact, la nivelul ţesuturilor, cu anticorpi potenţial precipitanţi, formînd „microprecipitate" în cuprinsul şi împrejurul vaselor mici, cu afectarea secundară a celulelor, sau cînd antigenul în exces reacţionează chiar în sînge cu precipitinele, formînd complexe circulante solubile, ce se depun pe pereţii vasculari, determinînd inflamaţia locală. Intensitatea fenomenului este proporţională cu titrul anticorpilor precipitanţi din ser (Opie,ş.a). Alterările locale constau în spasme arteriolare, lezarea endoteliilor vasculare cu formarea de trombi leucocitari şi exsudarea de lichid şi de celule sanguine în ţesuturi, toate acestea însoţite de o degenerare a colagenului. Antihistaminicele nu inhibează apariţia fenomenului.

3. *Reacţiile cutanate trecătoare* sînt asemănătoare celor observate în fenomenul Arthus, dar mult mai precoce decît acestea (cîteva minute după introducerea antigenului). Ele nu evoluează niciodată pînă la necroză. Sînt de fapt reacţii de tip histaminic tipic, provocate printr-o bruscă eliberare locală de histamină, care determină dilatarea imediată a capilarelor şi o creştere rapidă a permeabilităţii vasculare. Pot fi transmise pasiv, şi pot fi inhibate prin desensibilizare.

4. *Sensibilizarea atopică* (Coca şi Cooke) cuprinde o serie de fenomene particulare de sensibilizare, întîlnite la specia umană. Se cîştigă în mod natural, după o expunere incidentală la alergenele din mediul înconjurător. Inducerea ei se realizează cu unele substanţe ne proteice, prin contact direct. Aceste substanţe nu au caractere de antigene

adevărate, dar se pot comporta ca atare, la unii indivizi, prin cuplarea cu proteinele din organismul acestora. Ele pot fi foarte diferite, după natura lor chimică, şi după calea de acces în organism, şi ca origini foarte variate : pulberi, alimente, granule de polen, scuame etc.

În serul indivizilor sensibilizaţi s-au pus în evidenţă unii anticorpi speciali : reaginele, care nu neutralizează şi nici nu precipită cu antigenul (alergenul). Prin intermediul acestora se poate însă realiza o anafilaxie pasivă (prin transfer de ser specific), făcîndu-se proba Prausnitz-Küstner : se injectează, pe cale intradermică, unui individ normal, 0,1 ml ser provenit de la un donator sensibilizat; după 24—28 de ore, i se reinjectează, în acelaşi loc, 0,02 ml alergen. La locul injecţiei va apărea o reacţie locală urticariană, identică aceleia a donatorului. Natura reaginelor nu diferă esenţial de cea a anticorpilor propriu-zişi, deosebirile fiind mai mult cantitative. La electroforeză, reaginele — ca şi anticorpii — se identifică în grupa γ-globulinelor. Sînt însă termolabile (se distrug după o jumătate de oră la 56°). Unii autori (Kuhns şi Pappenheimer, 1952) atribuie sensibilizarea atopică lipsei de putere floculantă a serului donatorului sensibilizat. Ei cred că sensibilizarea s-ar datora elaborării, în organismul sensibilizat, a unei toxine neprecipitante, alta decît cea precipitantă elaborată de organismul normal, şi avînd proprietăţile anticorpilor incompleţi sau univalenţi.

Formele clinice pe care le îmbracă sensibilizarea atopică, destul de frecvent întîlnite în practică, sînt următoarele :

a) *Febra de fîn*, care se traduce prin accese paroxistice de coriză cu caracter sezonier, prin contactul mucoasei aparatului respirator cu granule de polen. Anumite componente antigenice din polen provoacă la indivizii sensibilizaţi, datorită unei predispoziţii genetice, accesele de coriză caracteristice, imediat după contactul, pe cale aerogenă, cu polenul din atmosferă.

b) *Astmul* se traduce prin crize paroxistice de sufocare sau dispnee (respiraţie zgomotoasă, cu prelungirea fazei expiratorii), provocate de obstrucţia bronhiolelor mici, ca urmare a spasmului musculaturii bronşice sau a tumefierii mucoasei. Sensibilizarea este determinată de alergene din grupul inhalanţilor sau ingestanţilor : praful domestic, grăunţele de polen, particule de pene, sau alte produse epiteliale, ca perii unor animale (pisici, cai, cîini etc.), a căror natură chimică nu este încă bine precizată. Printre cei de origine *alimentară* se situează, în primul rînd, unele produse lactate, preparate cu ouă, făină de grîu etc., iar între cele de natură *medicamentoasă* se numără : aspirina, piramidonul, antipirina, drogurile din grupul morfinei etc. Mecanismul declanşării atacului de astm pare a consta într-o liberare bruscă de histamină sau de substanţe înrudite acesteia (substanţa „H"), la nivelul organului de şoc respectiv (musculatura bronşică).

c) *Urticariile* se caracterizează prin modificări cutanate cu caracter inflamator şi edematos. Sensibilizarea şi declanşarea se fac, de regulă, pe cale digestivă, faţă de anumite alimente şi mai rar faţă de unele droguri (de exemplu, fenolftaleină).

d) *Edemul angioneurotic de tip Quincke* este datorit unei exsudări seroase de origine vasculară, care infiltrează cu predilecţie anumite regiuni (buzele, pleoapele, regiunea genitală, părţi ale feţei, sau chiar un braţ întreg), cuprinzînd straturile profunde ale corionului și țesutul subcutanat. Prinderea laringelui poate da accidente grave.

e) *Migrenele* au adesea o etiologie atopică. Crizele de cefalee sînt însoțite de tulburări senzoriale, ca greață și vărsături. Par a fi cauzate de o vasodilatație cerebrală. Factorul ereditar are un rol important, iar declanșarea crizelor este adesea provocată de un ingestant (aliment).

f) *Dermatitele atopice* sînt cunoscute în general sub numele de eczeme, în care însă se cuprind și numeroase alte inflamații dermice, cu alte etiologii. Pot fi declanșate de numeroși ingestanți, dar și de unii inhalanți.

g) *Sensibilizările atopice la paraziți* se instalează în urma infestării cu diferiți paraziți (schizostomiaza, helmintiazele intestinale, trichinoza, echinococoza, filarioza etc.) și se traduc prin testele cutanate cu extracte specifice.

h) *Alte tipuri de hipersenzibilizări atopice* sînt cele considerate de unii autori ca fiind la baza unor discrazii sanguine, de felul anemiei hemolitice cîștigate, a unor leucopenii, trombopenii etc., în care rolul anticorpilor sensibilizanți pare foarte important. Astfel, prin testul Coombs s-a arătat că celulele afectate (hematia, leucocitul, trombocitul) sînt combinate cu anticorpul sensibilizant. Dacă alergenul nu este antigenic prin el însuși, poate deveni antigen prin unirea cu anume constituienți ai acestor celule.

În ultima vreme există tendința de a se atribui o etiologie anafilactică și altor afecțiuni, între care două rețin mai ales atenția :

Periarterita nodoasă, o afecțiune inflamatoare generalizată a arterelor mici, la care se constată leziuni progresive, mergînd de la proliferarea intimei și inflamația structurilor periarteriale (*vasa vasorum* și limfatice), și pînă la ocluzia prin proliferare sau tromboză. Simptomele variază cu localizarea leziunilor arteriolare. Rich a găsit asemenea leziuni la indivizi morți prin accidente anafilactice, și la animalele (iepuri) care primiseră injecții repetate de proteine heterologe (ser de cal, de ovalbumină).

Boala reumatismală, caracterizată — între altele — prin prezența nodulilor Aschoff în inimă, foarte asemănători cu unele leziuni găsite în afecțiunile anafilactice. Cavelti atribuie etiologia cardiopatiilor reumatismale unor afecțiuni directe ale autoanticorpilor asupra țesutului cardiac. Rolul streptococului hemolitic în instalarea afecțiunii este neîndoios, dar pare că sensibilizarea nu s-ar datori unei componente specifice a acestuia, ci mai degrabă unei substanțe cu proprietăți sensibilizante elaborate de însuși țesutul afectat (autoantigen). Tot ca sindroame de sensibilizare anafilactică se mai socotesc, de unii, și afecțiuni ca : *lupusul eritematos diseminat*, unele *purpure*, unele *glomerulonefrite* etc.

Faptul că numeroase alergene incriminate în etiologia sensibilizărilor clinice nu sînt antigene, a pus în discuție asimilarea lor cu anafilaxia propriu-zisă. Astfel, alergenele întîlnite în multe sensibilizări medicamentoase sînt substanțe cu o moleculă mult mai mică decît aceea a antigenelor adevărate. Landsteiner a arătat însă că asemenea substanțe (de exemplu clorura de picril, arifenamina, 2—4-dinitroclorbenzenul) pot deveni antigene sensibilizante, prin cuplarea lor cu proteinele din organism. Gell și colaboratorii au confirmat aceste cercetări, arătînd că, injectate pe cale intraperitoneală, o serie întreagă de substanțe cu molecula mică determină apariția de precipitine în ser. Acestea nu pot fi însă decelate prin reacțiile obișnuite de precipitare, dar pot fi puse în evidență *in vitro*, dacă substanța este cuplată, în prealabil, cu gelatină.

În fine, un alt tip de sensibilizare de mare importanță în patologie, este aceea zisă „citolitică sau citotoxică",în care anticorpul reacționează — prin chiar „receptorii" săi, fie cu un component antigenic celular, fie cu un antigen sau haptenă intim legată de celulele din țesutul afectat. Rezultatul este un proces de *liză* sau un *efect citotoxic*.

Astfel, în cazul reacției dintre anticorp cu un component antigenic tisular (legat de celulă) se încadrează : „reacțiile transfuzionale" datorite lizei hematiilor „sensibilizate", cu sau fără participarea alexinei, și cu afectarea SRE. Tot printr-un astfel de tip de reacție se explică și „boala hemolitică a nou-născuților", fenomenul de „respingere a homogrefelor", ca și leziunile tisulare provocate de anticorpi și complement în cursul așa-numitelor „boli autoalergice" (exemplu : anemia hemolitică autoalergică etc.), ori acelea ce apar la organismele cu antigen Forssman—pozitive după injectarea de ser anti-Forssman.

În cazul în care anticorpul reacționează cu antigenul (sau haptena) adsorbite pe sau combinate cu celulele din țesuturi, se pot produce reacții citotoxice de tipul celor întîlnite în multe „sensibilizări medicamentoase", ori în nefritele acute provocate de infecțiile streptococice.

Alături de modul de sensibilizare specifică de tip anafilactic (imediat), în care am văzut că organismul se sensibilizează în afara vreunui contact infectant, acesta se mai poate sensibiliza și prin contactul cu diferite microorganisme, ori cu produse ale acestora. Acest din urmă tip de sensibilizare specifică, zisă de tip infecțios sau întîrziat, diferă prin unele caractere importante de cel anafilactic și este cunoscut, în genere, sub denumirea de alergie de infecție.

Termenul de alergie, creat încă din 1910 de Von Pirquet, înseamnă mod de comportare deosebit, întrucît se referă la capacitatea reacțională diferită pe care o manifestă față de diferite alergene un organism nou, în comparație cu unul deja sensibilizat. Sensibilizarea alergică de tip întîrziat se caracterizează prin faptul că între momentul injectării declanșante și acela al apariției răspunsului organismului trece o perioadă de timp mai îndelungată decît în cazul reacțiilor anafilactice. Pe lîngă deosebirile în ce privește durata răspunsului, între cele două tipuri de sensibilizare se mai constată și alte caractere distinctive importante :

a) *Simptomatologie*: fenomenele anafilactice se însoțesc de hipotensiune și hipotermie, cu contracția musculaturii netede și creșterea permeabilității vasculare ; cele alergice de tip întîrziat prezintă hipertermie și lipsa participării musculaturii netede.

b) *Etio-patogenie*: reacțiile anafilactice sînt consecința unui conflict între anticorpii umorali și antigenele specifice *in vivo*, iar sensibilizarea dobîndită poate fi transmisă pasiv ; sensibilizarea alergică întîrziată este independentă de anticorpii umorali și deci nu se poate transmite, pasiv, pe cale umorală.

c) *Histopatologie*: reacțiile anafilactice afectează cu predilecție anumite țesuturi : musculatura netedă, vasele sanguine și colagenul; reacţiile alergice întîrziate afectează — în grade diferite — *toate* celulele organismului.

Cu toate aceste deosebiri aparente, cele două tipuri de sensibilizare au un *fond imunologic comun* care se traduce prin:

— necesitatea prezenţei unui *stimul antigenic specific*, pentru inducerea stării de sensibilizare;

— declanşarea reacţiilor organismului sensibilizat se poate produce numai după un *contact* intim cu antigenul (alergenul);

— caracterul anamnestic al reacţiilor, apărînd după intervale variabile de timp;

— posibilitatea unei *desensibilizări* efective;

— *specificitatea* reacţiilor, în raport cu antigenul corespunzător.

Fiind indusă — de cele mai multe ori — în urma unui contact cu germeni patogeni, sensibilizarea întîrziată se mai numeşte şi sensibilizare de tip infecţios. Infecţiile care conferă în special acest tip de sensibilizare sînt: *vaccina* printre cele virale, *tuberculoza*, *sifilisul*, *bruceloza* şi *tularemia* şi, într-o măsură mai mică, *febra tifoidă*, *tusea convulsivă*, infecţiile *streptococice* şi *pneumococice*, printre cele bacteriene.

1. **Infecţia tuberculoasă** conferă cel mai tipic mod de sensibilizare alergică de tip întîrziat. Sensibilizarea se instalează în urma unui contact infectant cu bacili acidorezistenţi virulenţi, atenuaţi şi — în anume condiţii — şi cu bacili omorîţi. Organismul sensibilizat, devenit alergic, răspunde faţă de un nou contact bacilar (reinfecţie) prin reacţii alergice foarte caracteristice (locale, focale şi generale). Răspunsul poate fi provocat nu numai prin administrarea de bacili, dar şi de anumite produse de elaborare a acestora, şi în special de *tuberculină*. Aceasta din urmă determină, mai cu seamă prin administrare cutanată, reacţii alergice tipice cu caracter întîrziat, de unde şi extinderea denumirii de reacţii tuberculinice la toate reacţiile de tip întîrziat.

Alergia tuberculinică poate îmbrăca uneori şi un caracter de nespecificitate: astfel, Bordet a arătat că filtratul de colibacili, injectat la cobaiul tuberculos, provoacă o puternică reacţie hemoragică la locul de injecţie, congestia intensă a focarelor tuberculoase şi uneori chiar moartea animalului, cu fenomene de şoc tuberculinic. Holzberger şi Packalen au arătat că reacţia inflamatoare tuberculinică la animalul tuberculos este cu mult mai intensă după administrarea locală sau generală a filtratului de colibacili, decît chiar a tuberculinei. Forney a reuşit să confere sensibilizarea de tip întîrziat faţă de stafilococ în prezenţa cerei bacilare, iar Oprescu a putut-o conferi faţă de colibacil şi toxina acestuia, în prezenţa lipidelor cloroformosolubile bacilare.

Aceste *alergii nespecifice* de tip întîrziat se explică printr-un mecanism asemănător aceluia care stă la baza fenomenului Schwartzmann-Sanarelli.

Sanarelli a arătat (1923) că dacă se injectează intravenos unui iepure o doză inframortală de vibrioni holerici, iar la 24—48 de ore i se reinjectează o doză (inofensivă pentru animalul nou) din filtratul unei culturi de *Esch. coli* sau *Proteus* animalul moare după cîteva ore, în hipotermie. La autopsie se constată leziuni congestiv-hemoragice şi necrotice la nivelul mucoasei intestinale, în teritoriile invadate de vibrioni.

Schwartzmann a arătat (1928) că dacă se injectează intravenos unui iepure un filtrat microbian (de exemplu de *S. typhi* sau *N. meningitidis* etc.), la 24 de ore după ce animalul primise intracutanat o mică cantitate din acelaşi filtrat (sau dintr-un filtrat heterolog), la nivelul pielii astfel preparate apare, după 3—5 ore, o intensă reacţie congestiv-hemoragică, evoluînd spre necroză. La examenul histologic al regiunii afectate se constată tromboze, alterări ale vaselor sanguine şi hemoragii. Provocarea fenomenului se poate face cu diferite filtrate microbiene, homo- sau heterologe, dacă se are în vedere ca : 1) injecţia declanşantă să fie făcută intravenos şi 2) această injecţie să vină după 2—24 de ore de la cea preparantă.

Mecanismul fenomenului constă în acumularea de leucocite polimorfonucleare sub formă de exsudat, la nivelul injecţiei preparante, unde graţie metabolismului acestora se acumulează o mare cantitate de acid lactic (prin glicoliză anabiotică) (Thomas şi Stetson). În urma injecţiei declanşante, leucocitele se adună în grămezi mari, formînd trombi care obliterează capilarele sanguine, ceea ce duce la necroză vasculară şi, ca urmare, la hemoragii în teritoriul afectat. Fenomenul traduce existenţa unei *heteroalergii*, în declanşarea căreia *sistemul nervos autonom* are un rol important, atestat şi de faptul că injectarea filtratului microbian poate fi substituită prin iritarea marelui simpatic.

2. **Infecţia sifilitică** induce, de asemenea, instalarea unei sensibilizări de tip întîrziat. Animalul infectat cu *Tr. pallidum* răspunde la reinfecţii cu reacţii asemănătoare fenomenului Koch, în urma cărora se creează progresiv şi o stare de rezistenţă.

3. **Infecţiile micotice** pot induce şi ele sensibilizarea întîrziată testabilă prin probe cutanate de tip tuberculinic (de exemplu *Coccidioides* etc.).

Oricare ar fi agentul care o induce, este neîndoios că sensibilizarea de tip întîrziat nu este legată de prezenţa anticorpilor umorali, ci are totdeauna un suport celular general (sensibilizare tisulară).

Reacţii biologice (cutanate) de diagnostic

Pentru diagnosticul unora dintre bolile infecţioase, pe lîngă examenele practicabile *in vitro* prin diferite metode serologice, bacteriologice şi biochimice, se mai pot folosi şi cîteva probe *in vivo*, care constau în efectuarea unor *reacţii cutanate* care, datorită marii lor sensibilităţi şi specificităţi pot da indicaţii preţioase asupra naturii infecţiei.

După mecanismul lor de producere, reacţiile sau testele biologice (cutanate) de diagnostic sînt, după cum urmează, de 3 categorii :

1. **Teste bazate pe reacţii de tip „antigen-anticorp”**, în care mecanismul de producere se bazează pe neutralizarea toxinei prin antitoxina (anticorpul) corespunzătoare *in situ*. Din această categorie fac parte :

a) *reacţia Schick*, care serveşte pentru depistarea persoanelor receptive la *difterie*, după răspunsul acestora la injectarea intradermică a unei doze de toxină difterică echivalentă cu a cincizecea parte din doza minimă mortală pentru cobai (vezi capitolul *C. diphtheriae*);

b) *reacţia Dick*, care constă în injectarea intradermică de toxină eritrogenă scarlatinoasă (1 S.T.D./0,1 ml), constituie un preţios test de receptivitate față de *scarlatină* (reacția pozitivă traduce receptivitate, cea negativă, starea refractară);

c) *fenomenul „de stingere"* (Schultz-Charlton), care permite distingerea între *rash*-ul scarlatinos și alte reacții asemănătoare acestuia, dar avînd altă origine (de exemplu, intoxicații etc.), ceea ce îngăduie confirmarea diagnosticului de scarlatină (vezi infecțiile streptococice și scarlatina).

2. **Teste bazate pe reacții alergice de tip „întîrziat"**, care se instalează în urma unui contact cu germeni patogeni (de unde și denumirea de „sensibilizare de tip infecțios"), cum sînt:

a) *reacția la tuberculină*, care traduce răspunsul organismului infectat cu bacili tuberculoși, față de injectarea pe diferite căi, dar mai ales pe cea intradermică (testul Montoux) sau percutanată (testul Pirquet) de *tuberculină* (vezi capitolul *Micobacteriile și infecția tuberculoasă*);

b) *reacția la brucelină* — asemănătoare în ce privește modul de producere cu cea la tuberculină — constă în răspunsul organismului infectat cu germeni din grupul brucelelor, față de injectarea intradermică de antigene (alergene) bruceloase, fie sub formă de filtrate de cultură, fie de corpi microbieni omorîți, ori de anume fracțiuni chimice izolate din brucele (reacția Burnet). Ca și reacția la tuberculină, această reacție reprezintă un test de infecțiozitate, care traduce existența unei sensibilizări specifice rezultate dintr-un contact infectant anterior, fără a preciza dacă este vorba de boala evolutivă sau de o infectare ocultă retrospectivă (vezi capitolul *Brucella*);

c) *reacția la maleină* traduce răspunsul organismului infectat cu *Actin. mallei* (agentul morvei), după injectarea intradermică de extracte (lizate) microbiene din acești germeni;

d) *reacția Frei* este provocată de administrarea intradermică a unui antigen preparat din puroiul ganglionar al bolnavilor de boala Nicolas-Favre (limfogranulomatoza inghinală benignă), pentru al cărei diagnostic servește.

3. **Teste bazate pe șocul anafilactic local**, cuprind:

a) *probele pentru decelarea sensibilizării* unor persoane sensibilizate față de diferitele *seruri terapeutice* (injectarea intradermică prealabilă a unei diluții 1:10 din serul de administrat), în vederea preîntîmpinării bolii serului;

b) *reacția Cassoni*, pentru diagnosticul *echinococozei*, constînd în injectarea intradermică, la persoanele suspecte, a unui antigen preparat din lichidul de chist hidatic;

c) *reacția Prausnitz-Küstner*, care permite decelarea stării de sensibilizare față de un alergen, prin transfer de ser specific (anafilaxie pasivă), conținînd „reagine" (capitolul *„Sensibilizarea imunobiologică"*).

Toate aceste teste au astăzi o largă întrebuințare în clinică, și importanța lor devine tot mai mare pe măsură ce locul pe care fenomenele de sensibilizare îl ocupă în etio-patogenia a tot mai multe entități morbide, rămase obscure, devine mai important.

PARTEA a III-a

Bacteriologie specială

Clasificarea și nomenclatura bacteriilor

Prof. N. NESTORESCU

Studierea nesistematică a formelor și dezvoltării bacteriilor, legată mai ales de insuficiența cercetărilor privitoare la structura bacteriană, nu a îngăduit o descriere detaliată similară cu cea existentă azi la plante și animale și ca urmare nu s-a putut institui o clasificare asemănătoare acestora.

Pe de altă parte, necesitatea de a identifica un germen microbian ca agent cauzal al unei infecții date, printre care cercetarea patogenității sale era cel dintîi lucru de făcut, a îndepărtat multă vreme pe bacteriologii medicali de la sarcina de a se gîndi măcar la un sistem științific de clasificare a bacteriilor patogene. Puținele încercări de clasificare efectuate (Migula, 1894; Kruse, 1896; Lehman și Neuman, 1896; Orla Jensen, 1909, Castellani și Cahlmers, 1920) au folosit mai totdeauna criterii deosebite, legate de caractere particulare ale germenilor microbieni care nu erau de aceeași valoare, ceea ce a făcut ca multe din ele să împrumute un caracter de compromis, luînd mai totdeauna înfățișarea unor clasificații de larg utilitarism.

Chiar clasificarea bazată pe concepția că specia este expresia unei serii filogenetice, clasificare deosebit de utilă în multe alte ramuri ale biologiei, nu a putut fi întrebuințată. Această clasificație cere o decizie asupra capetelor de serie, care, pentru bacterii, este greu de luat. Însăși clasificația lui Kluyver și Van Niel (1936) care folosește drept capăt de serie a sistemului natural de clasificare criteriul morfologic îmbinat cu criterii legate de necesitățile nutritive și surse principale de energie utilizate, nu satisface în unanimitate pe bacteriologi. De altfel chiar Van Niel opinează că actualele noastre cunoștințe de morfologie și fiziologie bacteriană nu permit o clasificare naturală a bacteriilor.

Pentru motivele de mai sus, s-a căzut astăzi de acord ca în bacteriologia medicală să fie folosite drept criterii mai ales pentru identificare, caracterele de patogenitate și de structură antigenică ale germenilor microbieni, deși nici acestea nu permit totdeauna o clasificare satisfăcătoare. Tendința dominantă pentru bacteriologii care se ocupă cu alte ramuri ale bacteriologiei decît cea medicală, de a neglija toxicitatea și patogenitatea germenilor microbieni în favoarea scopului taxonomic este, după Wilson şi Miles, eronată. „Capacitatea unor germeni de a creşte în ţesuturile umane şi animale, de a produce modificări ale compoziţiei chimice a gazdei, ca şi de a duce cîteodată la modificări constituţionale şi chiar la moarte, este una din cele mai izbitoare proprietăţi ale bacteriilor" (Wilson şi Miles, 1957).

*

Clasificarea germenilor microbieni foloseşte un cod internaţional de nomenclatură care a fost adoptat abia în 1930, cu ocazia primului Congres Internaţional de microbiologie, care a avut loc la Paris. De la această dată şi pînă la al VIII-lea Congres de microbiologie care a avut loc la Montreal în 1962, codul internaţional de nomenclatură a fost mereu amendat cu ocazia diferitelor congrese internaţionale de microbiologie, care au avut loc între timp. De altfel, subiectul referitor la nomenclatura bacteriană, rămînînd mereu actual, face parte din programul permanent al acestor congrese şi hotărîrile luate, pe baza unor discuţii largi, sînt apoi difuzate în lumea bacteriologilor.

1. În acest cod apare deseori termenul de *specie* microbiană. „Termenul este greu de definit cu preciziune, din cauză că o specie nu este o entitate definită, ci mai curînd o concepţie taxonomică" (Hitchcock, 1925). Totuşi, specia microbiană poate fi considerată o unitate de clasificare a unui grup închegat de indivizi asemănători (Buchanan).

Problema speciei microbiene este şi azi mult discutată ; făcînd parte integrantă din materie, bacteriile se supun procesului dialectic, cu particularităţile întîlnite la materia vie. Însă, în opoziţie cu ceea ce se întîmplă la plantele şi animalele cu reproducere biparentală unde fenomenele de sexualitate joacă rolul fundamental, la bacterii reproducerea normală este pur clonală. Din această cauză, la microorganisme „nu există specii adevărate, ci numai clone ale căror proprietăţi globale nu rămîn de fapt constante, decît atît timp cît mediul nu variază" (L'Héritier). Printre acestea, procesele continue de mutaţie şi selecţie ocupă un loc predominant. Concepţia lui Cohn şi Koch care considerau specia ca o realitate statică, fixă, nu mai are azi decît valoarea unui fapt istoric. În lumina cunoştinţelor noastre actuale de genetică în general şi de genetică microbiană în particular, ca şi a faptelor de observaţie întîlnite în laborator, specia microbiană poate suferi modificări care să intereseze unul sau mai multe caractere ; se pare însă că mai toate aceste variaţii se fac în interiorul speciei respective însă, totdeauna după legi genetice, azi mai bine cunoscute, decît două decenii în urmă.

Necesitatea de a identifica o specie microbiană în scop medical obligă pe bacteriolog să considere ca permanente unele caractere ale germenilor microbieni patogeni. Această conduită este valabilă numai în măsura în care fiecare caracter este considerat izolat. Dacă el studiază, aşa cum este obligat, un număr de caractere care privesc morfologia, însuşirile biochimice şi de metabolism, structura antigenică şi de patogenitate, precum şi provenienţa şi condiţiile lui ecologice, naturale sau modificate de tratamentul specific şi de antibioticele cu care au venit în contact bacteriile în antecedentele lor, interpretarea rezultatelor, efectuată pe baza unui sever discernămînt dialectic, trebuie să fie legată de relațiile reciproce ale acestor caractere și al variabilității lor, mai ales în raport cu procesul morbid pe care îl urmărește.

Pentru a ușura mînuirea speciei microbiene în complexul codului de nomenclatură, Comitetul Internațional de nomenclatură a fixat următoarele reguli:

a) Fiecare fel *distinct* de bacterie este numită o *specie.*

b) Fiecare specie distinctă de bacterie primește, după regulile stabilite de Linné, un nume format din două cuvinte latinești: de exemplu, *Bacillus anthracis.*

c) Primul cuvînt este numele genului sau grupului căruia îi aparține specia. El este un cuvînt latin sau grec latinizat, iar dacă nu se întîlnește în vocabularul latin este latinizat. Inițiala este scrisă totdeauna cu literă majusculă.

d) Al doilea cuvînt este un epitet specific. El nu este niciodată scris cu majusculă. Acest cuvînt poate fi un adjectiv modificînd substantivul, de exemplu: *Bacterium album*, un adjectiv provenit din participiul prezent al unui verb, de exemplu: *Clostridium dissolvens*, un substantiv în genitiv, de exemplu: *Salmonella pullorum* sau un substantiv în apoziție de exemplu: *Actinomyces scabies.*

e) Unele specii de bacterii sînt subîmpărțite în subspecii sau varietăți, de exemplu: *Streptococcus lactis*, subspecia (varietatea) *maltigens*, sau mai simplu: *Streptococcus lactis maltigens.*

2. *Genul* sau *grupul* este constituit din specii înrudite.

Genul poate să includă o singură specie, în care caz este denumit monotipic, însă cel mai adesea conține mai multe specii. Definirea genului sau grupului este tot așa de greu de făcut ca și la specie. În general pentru includerea unei specii într-un gen sau grup se procedează în felul următor: se desemnează o specie care ia denumirea de specia tip; pe de altă parte, toate speciile, pe care taxonomistul le socotește că posedă caractere suficiente de înrudire cu specia tip, sînt incluse în acest gen sau grup. Datorită subiectivității taxonomistului, unui gen sau grup i se pot include mai multe specii, sau, dimpotrivă, un gen sau grup mai mare să fie desfăcut în genuri sau grupuri mai mici.

3. *Familia.* Taxonomic, o familie este o grupă de genuri înrudite. Numele unei familii este format din numele unuia din genurile pe care le cuprinde și căruia i se adaugă sufixul „aceae"; de exemplu: genul *Bacillus*, familia *Bacillaceae*; genul *Spirillum*, familia *Spirillaceae.*

Există și alte familii care fac excepție, de pildă, genurile *Salmonella, Shigella, Escherichia* etc., fac parte din familia *Enterobacteriaceae.*

4. *Ordinul* este o grupă de familii înrudite. Numele unui ordin este format din înlocuirea sufixului „aceae", al uneia din familiile componente, prin sufixul „ales"; de exemplu: familia *Actinomycetaceae*, ordinul *Actinomycetales*; familia *Spirochaetaceae* ordinul *Spirochaetales* etc.

Unele ordine prea mari pot fi împărțite și în subordine, de pildă ordinul *Pseudomonadales* este devizat în subordinele *Rhodobacterineae* și *Pseudomonadineae.*

5. *Clasa* este o grupă de ordine înrudite. Bacteriile fac parte din clasa *Schizomycetes*, care cuprinde azi 10 ordine.

După Bergey, în clasa *Schizomycetes* sînt cuprinse plante tipic unicelulare, formate din celule mici, microscopice, frecvent mobile, pose-

Tabelul X

Clasificarea genurilor care cuprind bacterii patogene pentru om

Ordinul	Familia	Genul
Pseudomonadales	*Pseudomonadaceae*	*Pseudomonas*
	Spirillaceae	*Vibrio*
Eubacteriales	*Rhizobiaceae*	*Chromobacterium*
	Enterobacteriaceae	*Escherichia*
		Aerobacter
		Klebsiella
		Erwinia
		Serratia
		Proteus
		Salmonella
		Shigella
	Brucellaceae	*Pasteurella*
		Bordetella
		Brucella
		Haemophilus
		Actinobacillus
		Calymmatobacterium
		Moraxella
		Noguchia
	Bacteridaceae	*Bacteroides*
		Fusobacterium
		Dialister
		Sphaerophorus
		Streptobacillus
	Micrococcaceae	*Micrococcus*
		Staphylococcus
		Gaffkya
		Sarcina
		Peptococcus
	Neisseriaceae	*Neisseria*
		Veilonella
	Lactobacillaceae	*Streptococcus*
		Leuconostoc
		Peptostreptococcus
	Corynebacteriaceae	*Corynebacterium*
		Listeria
		Erysipelothrix
	Bacillaceae	*Bacillus*
		Clostridium
Actinomycetales	*Mycobacteriaceae*	*Mycobacterium*
	Actinomycetaceae	*Nocardia*
		Actinomyces
Spirochaetales	*Treponemataceae*	*Borelia*
		Treponema
		Leptospira
Rickettsiales	*Rickettsiaceae*	*Rickettsia*
		Coxiella

Tabelul XI

Clasificarea germenilor microbieni în clase, ordine și familii

Clasa	Ordinul	Subordinul	Familia
1. Schizophyceae			
2. Schizomycetes	*1. Pseudomonadales*	*Rhodobacteriineae*	*Thiorhodaceae*
			Athiorhodaceae
			Chlorobacteriaceae
		Pseudomonadineae	*Nitrobacteriaceae*
			Methanomonadaceae
			Thiobacteriaceae
			Pseudomonadaceae
			Caulobacteriaceae
			Siderocapsaceae
			Spirillaceae
	2. Chlamydobacteriales		*Chlamydobacteriaceae*
			Peloplocaceae
			Crenotrichaceae
	3. Hyphomicrobiales		*Hyphomicrobiaceae*
			Pasteuriaceae
	4. Eubacteriales		*Azotobacteriaceae*
			Rhizobiaceae
			Achromobacteriaceae
			Enterobacteriaceae
			Brucellaceae
			Bacteroidaceae
			Micrococcaceae
			Neisseriaceae
			Brevibacteriaceae
			Lactobacillaceae
			Propionibacteriaceae
			Corynebacteriaceae
			Bacillaceae
	5. Caryophanales		*Caryophancaeae*
			Oscillospiraeceae
			Arthromitaceae
	6. Actinomycetales		*Mycobacteriaceae*
			Actinomycetaceae
			Streptomycetaceae
			Actinoplanaceae
	7. Beggiatoales		*Beggiatoaceae*
			Vitreoscillaceae
			Leucotrichaceae
			Achromatiaceae
	8. Myxobacteriales		*Cytophagaceae*
			Archangiaceae
			Sorangiaceae
			Polyangiaceae
			Myxococcaceae
	9. Spirochaetales		*Spirochaetaceae*
			Treponemataceae
	10. Mycoplasmatales		
3. Microtatiobiotes	*1. Rickettsiales*		*Rickettsiaceae*
			Chlamydiaceae
			Bartonellaceae
			Anaplasmataceae
	2. Virales		*Afectînd bacteriile (bacteriofagii)*
			Afectînd omul și animalele
			Afectînd plantele

dînd un nucleu. Celulele bacteriene individuale pot fi sferice, bastonașe curbate sau spiralate. Ele pot apărea în mase regulate sau neregulate și adesea în ciști. Pot produce sau nu pigment. Pigmentul posedă proprietăți fotosintetice. Multiplicarea tipică se efectuează prin diviziune celulară. Unii pot forma endospori. Bacteriile pot avea o viață independentă, saprofită, parazită și adesea patogenică. Ultimele tipuri determină boli la plante și animale.

În afară de clasa schizomicetelor, sistematica bacteriană cuprinde clasa *Microtatobiotes*, în care sînt cuprinse ordinele *Rickettsiales* și *Virales*.

Redăm în tabelele X și XI clasificația claselor *Schizomycetes* și *Microtatobiotes* în ordinele, familiile și genurile respective, după Bergey (Manual of determinative Bacteriology, sevennth edition, 1957).

Metode de identificare a bacteriilor patogene

În raport cu biologia bacteriei în studiu, metodele de identificare variază. Astfel, punerea în evidență a unui germen piogen într-un focar închis (stafilococ, streptococ etc.), *Treponema pallidum* într-o secreție, *M. tuberculosis* într-o spută tuberculoasă, *M. leprae* într-o leziune leproasă etc., se poate efectua numai prin examene morfologice, folosind după caz fie microscopul optic luminiscent, fie examinarea pe fond întunecat, fie, în sfîrșit, microscopia cu fluorescență.

Majoritatea bacteriilor nu pot fi însă identificate decît prin metode complexe de identificare. Aceste metode nu pot fi aplicate decît pe bacterii obținute în cultură pură.

Metodele complexe se sprijină pe cercetarea morfologică și tinctorială, pe studiul caracterelor biochimice și de rezistență la agenți fizici și chimici, pe stabilirea completă a structurii antigenice, ca și pe a caracterelor de patogenitate etc. Pe de altă parte, trebuie totdeauna precizate relațiile dintre germenul examinat și organismul infectat în vederea stabilirii aspectelor și desfășurării procesului morbid.

Metodele complexe de punere în evidență a unui germen microbian sînt operații lungi și laborioase; un singur procedeu nu are decît o valoare relativă. Numai coroborarea rezultatelor obținute cu ajutorul metodelor complexe permite confirmarea rolului etiologic al unui germen patogen.

Pentru motivele arătate mai sus, bacteriologia specială își extinde exigențele pe măsură ce apar noi metode de identificare și de studiu, legate fie de cunoașterea mai amănunțită a biologiei germenilor, fie de cunoașterea mai detaliată a reactivității organismelor infectate.

Genul Staphylococcus şi infecţiile stafilococice

Dr. Marcella Popovici

Clasificare. Stafilococii sînt situați în sistematica bacteriană în ordinul *Eubacteriales*, familia *Micrococcaceae*, genul *Staphylococcus*.

Specia tip: *Staphylococcus aureus Rosenbach.*

Istoric. Primul care a notat prezența micrococilor în puroi a fost Koch, în 1878. Doi ani mai tîrziu, Pasteur (1880) a cultivat pe mediu lichid stafilococii din conținutul unui furuncul. Rosenau l-a obținut în cultură pură, diferențiind două variante: *St.pyogenes aureus* și *St. pyogenes albus*. În 1885, Passet a adăugat varianta *St. citreus*.

De studiile asupra stafilococului sînt legate o serie de descoperiri importante, printre care: descoperirea bacteriofagului (Twort, 1915); studierea toxinei stafilococice (Burnet, 1929-1931); descoperirea penicilinei (Fleming, 1929); separarea enterotoxinei stafilococice ca fracțiune toxică distinctă (Dack, 1943); rezistența germenilor la antibiotice și mecanismul acestei rezistențe etc.

Habitat. Germeni larg distribuiți în natură, sînt frecvent întîlniți în stare saprofită pe piele și mucoase, în cavitățile naturale ale omului și animalelor. Stafilococi potențial patogeni pot fi găsiți la purtători sănătoși în cavitatea bucală și rino-faringiană și în conținutul intestinal; după unele statistici, proporția acestora poate depăși 70% (Vogelsang, 1953). Din cavitatea rino-faringiană germenii sînt răspîndiți în mediul extern prin tuse, strănut și vorbirea obișnuită. Stafilococi patogeni sînt izolați frecvent din procese supurative, cu localizări variate. Ei mai pot fi izolați din aer, apă și sol.

Caractere morfologice și afinități tinctoriale. De formă perfect sferică coc atunci cînd sînt izolați, stafilococii se pot prezenta ca celule ovale, și chiar turtiți pe o parte, cînd sînt grupați. Diametrul sferei este de 0,8-1μ, aceste dimensiuni putînd varia în cadrul aceleiași specii, în raport cu factori diverși, printre care: vîrsta culturii și condițiile de mediu.

Are o dispoziție caracteristică, în grămezi neregulate sau ciorchine (diviziunea celulelor făcîndu-se după diametre care se întretaie în același plan). Această dispoziție poate fi observată mai ales în culturi dezvoltate pe medii solide. În culturi în bulion se întîlnesc şi lanţuri scurte sau grupări în diplo. În produse patologice, în puroi, sînt de asemenea dispuşi în lanţuri scurte, perechi sau izolaţi, de cele mai multe ori extracelulari, foarte rar intracelulari.

Sînt necapsulaţi; totuşi unii cercetători, ca Lyons, Zinsser au descris formaţiuni capsulare sau pseudocapsulare care apăreau în culturi tinere în bulion (vîrsta de 3-6 ore) şi care dispăreau în culturi mai vechi.

Lipsiţi de flageli, stafilococii sînt imobili; sînt nesporulaţi. Prezintă o afinitate deosebită pentru coloranţii de anilină. Sînt gram-pozitivi.

În raport cu vîrsta culturii, se observă variaţii în afinitatea pentru colorant şi rezistenţa la decolorare, celulele bătrîne avînd tendinţa să-şi piardă cu uşurinţă culoarea sub acţiunea decolorantului.

Sub influenţa penicilinei s-a semnalat de asemenea apariţia de variante de stafilococi gram-negativi.

Caractere de cultură: stafilococii cresc cu uşurinţă pe medii obişnuite de cultură: în bulion, după incubare 24 de ore la 37°, stafilococii tulbură uniform mediul, formînd un depozit moderat la fundul tubului. Unele specii, de pildă specia „salivarius”, dezvoltă un depozit gros, gleros, lăsînd mediul clar; după 48 de ore se observă formarea unui inel sau chiar a unei pelicule la suprafaţa mediului.

Pe geloză dezvoltă colonii rotunde de 1-2 mm diametru, opace, cu suprafaţa convexă, netedă sau uşor granulară, cu margini regulate, de consistenţă moale, uşor detaşabile de pe suprafaţa mediului. Coloniile foarte tinere sînt totdeauna incolore; ulterior ele se pigmentează. Prezenţa pigmentului a permis diferenţierea celor 3 variante de stafilococ: „*aureus*”, „*citreus*” şi „*albus*”. Prin disociaţie microbiană se poate obţine o bogată gamă de variante morfologice „S—R”, colonii „G” pitice, colonii „M” mucoase etc.

Sub influenţa bacteriofagului, tulpinile sensibile de stafilococ pot dezvolta colonii transparente, vitroase, stelate etc.

Sub influenţa substanţelor antibiotice în doze subbacteriostatice apar colonii mici, necaracteristice, care se dezvoltă lent.

Pe gelatină (plăci), cu incubare la 22°, dezvoltarea coloniilor se face încet, în decurs de 2—3 zile. O zonă de lichefiere poate apărea în jurul coloniilor, care sînt mici şi nepigmentate.

În mediul cu cartof stafilococul cultivă bogat, dezvoltînd colonii pigmentate.

Mediul cu ser coagulat de bou este de asemenea favorabil pentru dezvoltarea pigmentului.

Caractere biochimice şi de metabolism. Aerobi şi facultativ anaerobi, stafilococii se dezvoltă în limite foarte largi de temperatură, 12—45°, cu optim de dezvoltare la 37°. Aceeaşi toleranţă largă o manifestă stafilococii şi în cea ce priveşte reacţia chimică a mediilor de cultură, putînd creşte chiar şi la pH acid de 4—5, cu un optim la pH 7,2—7,4—7,6.

Cultivarea este stimulată de adăugare de sînge şi geloză.

Stafilococii sînt capabili să se dezvolte în prezenţa unei cantităţi mari de ClNa ($75\ g^{0}/_{00}$), caracteristică care stă astăzi la baza preparării mediilor de îmbogăţire şi selective hiperclorurate, folosite pentru izolarea stafilococului din produse cu floră microbiană asociată.

Se pot dezvolta şi în medii sintetice, necesitînd prezenţa anumitor factori de creştere. Principalii factori de creştere necesari stafilococului s-au dovedit a fi tiamina (vitamina B_1), acţionînd ca un catalizator în oxidarea acidului piruvic şi acidul nicotinic, factor esenţial în metabolismul glucozei.

Crescînd pe medii sintetice, stafilococii s-au arătat capabili să sintetizeze riboflavina şi, probabil, şi ceilalţi componenţi ai complexului B.

Sînt dotaţi cu oarecare proprietăţi proteolitice, fiind capabili să lichefieze gelatina. În genere, s-a observat o proporţie mai mare de tulpini gelatinolitice printre stafilococii aurii, decît printre cei albi sau citrini, printre cei izolaţi din produse patologice, decît printre cei izolaţi de pe piele, din aer, apă.

Însămînţînd mediul prin înţepătură, se obţine lichefierea în pîlnie, în interval de 2–3 zile.

Au acţiune coagulantă asupra laptelui şi peptonifică cheagul prin proteoliză.

Nu produc indol în medii cu apă peptonată, au capacitatea de a fermenta o serie largă de zaharuri, printre care glucoza, maltoza, zaharoza şi uneori lactoza şi manita. Aceasta din urmă a fost folosită chiar ca test de patogenitate *in vitro*, o bună parte din tulpinile patogene arătîndu-se capabile de a fermenta manita (după Vîgodcikov, 63%).

Nu fermentează dulcita, fermentează rareori salicina, inulina şi rafinoza. Majoritatea hidrocarbonatelor sînt fermentate cu producere de acid, fără gaz. Reacţia cu roşu de metil şi reacţia Voges-Proskauer sînt pozitive.

După unii autori (Winslow, Rothberg şi Parsons), majoritatea stafilococilor reduc nitraţii în nitriţi. Reduc turnesolul şi albastrul de metilen şi sînt în genere slab producători de hidrogen sulfurat.

În ceea ce priveşte elaborarea de pigment, aceasta este mai activă la 20–22° şi în aerobioză; în anaerobioză producţia de pigment încetează. Pigmentul rămîne localizat în colonie şi nu difuzează în mediu. Este solubil în alcool, eter, cloroform, benzen. A fost clasificat ca un lipocrom. Unii cercetători consideră pigmentul auriu ca un criteriu de patogenitate. Alţii, ca Vîgodcikov, Christie, îi atribuie un rol redus şi printre argumentele care sprijină opinia acestor autori este şi faptul că tulpina Wood, folosită ca tulpină toxigenă standard, este producătoare de pigment alb.

Mai mult decît atît, se discută chiar dacă pigmentogeneza la stafilococ constituie un caracter stabil, sau este tranzitorie, dat fiind că prin disocierea unor tulpini aurii o serie de autori (Nahour, Boniece, 1957) au izolat şi colonii aurii şi colonii albe.

Rezistenţa la agenţi fizici, chimici şi biologici. Stafilococii manifestă o rezistenţă marcată faţă de agenţii de mediu extern. În culturi, în bulion sau pe geloză, în tuburi parafinate, supravieţuiesc luni de zile la temperatura camerei şi mai ales la gheţar. În puroi uscat trăiesc 2–3 luni. Supuşi acţiunii căldurii, necesită o expunere de 60 de minute la 60° pentru a fi omorîţi.

Agenţi chimici. Fenolul 2% îi omoară în 15 minute, iar în concentraţie de 4%, în 10 minute. Sublimatul 1‰ îi omoară în 10 minute, alcoolul de 50–70° în 60 de minute.

Sînt sensibili la acțiunea coloranților de anilină. Violetul de genţiana, cristal-violetul, verdele malahit, fucsina acidă şi alte asemenea substanțe colorante inhibă, în anumite concentraţii, dezvoltarea stafilococilor, în altele fiind chiar bactericide.

Sînt sensibili la acțiunea sulfamidelor, în oarecare limite.

Substanțe antibiotice. Stafilococii sînt sensibili la acţiunea penicilinei fiind omorîţi de 0,1—1 unităţi de penicilină.

Faţă de streptomicină, stafilococii sînt mai puţin sensibili (1—120γ/ml).

Sînt foarte sensibili faţă de aureomicină, teramicină, tirotricină, mai puţin sensibili faţă de cloramfenicol; arată de asemenea, sensibilitate faţă de eritromicină şi magnamicină. Novobiocina are o activitate electivă pentru coci şi în special pentru stafilococi, cantităţile inhibitorii mijlocii fiind de 0,1--0,2 γ/ml. Kanamicina, de asemenea, acţionează asupra stafilococului în doze pînă la 3—4 γ/ml.

Rezistenţa faţă de substanţele antibiotice a devenit o problemă de importanţă crescîndă în ultima decadă, o dată cu folosirea pe scară largă a tratamentelor cu antibiotice.

Încă din 1944, Kirby a arătat cel dintîi că rezistenţa la penicilină a stafilococilor este legată de producerea de penicilinază. Ulterior s-a văzut că nu toate tulpinile penicilinorezistente elaborează penicilinază şi că în asemenea cazuri rezistenţa se datoreşte şi altor mecanisme.

Cele trei modele de rezistenţă admise astăzi sînt: *rezistenţa naturală de specie*; *rezistenţa naturală individuală în cadrul speciei*; *rezistenţa dobîndită*, condiţionată de natura antibioticului şi de particularităţile germenului.

Rezistenţa naturală este în mod obişnuit permanentă, pe cînd cea indusă, căpătată prin contact repetat cu antibioticul respectiv, este reversibilă, tulpinile devenite rezistente revenind la forma iniţială cînd sînt trecute pe medii lipsite de antibiotic.

Atît observaţiile clinice, cît şi cele experimentale (Nestorescu şi colaboratorii, 1958) au arătat deosebiri în ce priveşte viteza cu care stafilococii capătă rezistenţă la diferitele antibiotice folosite şi proporţia tulpinilor care devin rezistente.

Bacteriofagi. După cum se ştie, primele cercetări ale lui Twort asupra bacteriofagului au fost efectuate pe colonii de stafilococ. Stafilococii s-au dovedit sensibili la acţiunea bacteriofagului.

În 1940, Fisk a demonstrat lizogenitatea tulpinilor de stafilococ, din care a izolat diferite preparaţiuni fagice. Folosind asemenea specimene de fag, el a demonstrat că tulpinile de stafilococi pot fi diferenţiate, pe baza sensibilităţii lor, în tipuri bacteriofagice.

În continuare, Wilson şi Atkinson (1945) au obţinut, prin adaptări pe alte tulpini de propagare, noi fagi.

Metoda de lizotipie a stafilococilor a fost dezvoltată şi standardizată, în 1952, de Williams şi Rippon. Actualmente se folosesc în practica lizotipiei un set de bază compus din 21 de preparaţiuni fagice, care, după zona lor de activitate, sînt grupate în 4 grupe, şi anume:

Grupa I: 29, 52, 52 A, 79, 80, 81.
„ II: 3 A, 3 B, 3 C, 55, 71.
„ III: 6, 7, 42 E, 47, 53, 54, 75, 77.
„ IV: 42 D.
În afara grupelor: 187

În afară de fagii setului de bază, s-au mai descris și o serie de fagi adiționali. Sînt tipabili cu ajutorul fagilor arătați mai sus numai stafilococii patogeni coagulazopozitivi.

Diferențierea stafilococilor cu ajutorul lizotipiei are o largă aplicație în investigația epidemiologică, în recunoașterea originii și filiației contaminărilor în infecțiile cu aspecte epidemice.

Structura antigenică a stafilococilor s-a dovedit foarte eterogenă. S-au descris în structura antigenică a stafilococilor fracțiuni polizaharidice și fracțiuni proteice.

In ceea ce privește fracțiunile polizaharidice, Julianelle și Wieghard au izolat, în 1935, un polizaharid „A" specific tulpinilor de stafilococi patogeni și un polizaharid „B" din cele nepatogene.

Cei doi polizaharizi au arătat deosebiri de ordin chimic, demonstrabile prin rotație optică și prin diferențe în produsul final al hidrolizei.

Ulterior s-a descris, tot la tulpini patogene (Cowan), un al treilea polizaharid, fracțiunea „C".

Cu ajutorul unor seruri aglutinante, preparate cu culturi de stafilococ formolate sau încălzite la 62° ori la 100°, Cowan a reușit, prin teste de aglutinare și de absorbție încrucișate, să diferențieze 3 tipuri serologice principale : I, II și III. Mai tîrziu (1940), Christie și Keogh au obținut diferențierea altor 6 tipuri: 4, 5, 6, 7, 8 și 9, iar în 1948, B. Hobbs a propus tipurile 10, 11, 12 și 13. Diferențierea serologică a stafilococilor este însă aproape imposibilă, din cauza multiplelor reacții de grup.

Prin experiențe de absorbție încrucișată Per Oeding (1953) a pus în evidență, în structura antigenică a stafilococilor, 9 factori antigenici diferențiabili prin metode fizice și chimice, dintre care 5 (*a*, *b*, *c*, *d*, *e*,) au fost considerați ca antigene de grup, iar ceilalți 4 *f*, *h*, *i* și *k* ca antigene specifice. Mai tîrziu, Grün a descris antigenul „*l*" prezent mai ales la tulpinile de stafilococi de proveniență animală, iar Haukenes și Oeding (1960) antigenele „*m*" *și* „*n*".

In 1940, Verwey a pus în evidență o proteină cu specificitate de grup. Jensen a extras din *Staphylococcus aureus* un antigen care nu este prezent la *Staphylococcus albus* și considerat inițial de natură polizaharidică. Recent, Löfquist și Sjöquist au demonstrat că antigenul Jensen ar fi identic cu proteina descrisă de către Verwey.

In 1964, Barber, Popovici și Alexenco au pus în evidență la stafilococii aurii o proteină practic lipsită de fosfor, care reacționează specific cu serururile microbiene antistafilococi aurii și cu serurile de om, dar nu reacționează cu serurile antitoxice antistafilococice preparate pe cal și nici cu serurile antistafilococice obținute cu stafilococi albi nepatogeni.

Per Oeding a arătat că formula antigenică a tulpinilor de stafilococ poate fi dependentă de anumite condiții de mediu, prin distribuirea diferită a antigenelor blocante.

Cunoștințele asupra structurii antigenice a stafilococilor sînt departe de a fi complete și necesită studii în continuare.

Caractere de patogenitate. După cum s-a arătat, stafilococii prezintă pe lîngă formele comensale, oaspeți obișnuiți ai organismului normal, uman și animal, și forme parazite, patogene, capabile să producă cele mai variate procese morbide.

Stafilococii patogeni îşi datoresc puterea lor patogenă, atît virulenţei, cît şi capacităţii lor de a elabora toxine. Predominenţa unuia sau celuilalt dintre aceşti factori condiţionează, în oarecare măsură, aspectul şi evoluţia infecţiei.

Toxigeneza. Stafilococii au capacitatea de a elabora toxine difuzibile, exotoxine. Primul care a pus în evidenţă toxicitatea filtratelor de stafilococ a fost Arloing, în 1891. Numeroşi alţi cercetători au continuat ulterior studiul toxinelor elaborate de stafilococ, punînd în evidenţă efectele lor hemolitice, dermonecrotice şi letale. Cercetările asupra toxinei stafilococice şi proprietăţilor ei, ca şi asupra modului de preparare a toxinei au căpătat amploare începînd din 1929, cu ocazia accidentului de la Bundaberg. Tehnica descrisă de Burnet (1930) pentru prepararea toxinei prin cultivarea stafilococilor pe geloză semilichidă, cu incubare în atmosferă de 20—30% CO_2, urmată de centrifugarea şi filtrarea culturilor, a rămas pînă astăzi la baza metodelor de preparare a toxinei stafilococice.

Filtratul toxic obţinut exercită efecte toxice multiple, printre care: activitate hemolitică, activitate dermonecrotică, efect letal, activitate leucocidinică etc.

Activitatea hemolitică: s-au descris pînă în prezent 5 hemolizine, diferite atît prin activitatea lor, cît şi prin modul de comportare la agenţi fizici şi chimici. Bigger în 1933 şi Glenny şi Stevens în 1935 au demonstrat existenţa hemolizinelor α şi β.

Hemolizina α, elaborată mai ales de stafilococii de origine umană, este cea mai bine studiată. Elaborarea ei constituie un preţios indiciu de patogenitate. Determină liza completă, după incubare la 37°, a globulelor roşii aparţinînd la diferite specii animale, cele mai sensibile fiind hematiile de iepure. În ordinea gradului de sensibilitate se situează hematiile de bou, oaie, şobolan, om, cal şi cobai.

Insămînţînd stafilococul de cercetat pe o placă cu geloză-sînge, hemolizina α produce, după incubare la 37°, o zonă clară de hemoliză cu margne nebuloasă în jurul ariei de cultură. Între activitatea hemolitică şi efectul dermonecrotic şi letal s-a notat un strîns paralelism. Hemolizina α are marcate calităţi antigenice. Este sensibilă la acţiunea căldurii, fiind inactivată prin încălzire la 57°, timp de 30 de minute.Este specific neutralizată de serul antihemolitic α. Este precipitată prin precipitanţii obişnuiţi ai proteinelor.

Sub acţiunea formolului (2—4 ‰) la 37°, se transformă în toxoid, cu pierderea activităţilor toxice şi păstrarea calităţilor antigenice. Rolul hemolizinei α în patogenia infecţiilor stafilococice este însă discutat. Dacă unii autori îi atribuie o contribuţie importantă în mecanismul acţiunii letale, alţii (Blair, 1958), dată fiind activitatea litică slabă a hemolizinei α asupra hematiilor umane, sînt înclinaţi a nu-i acorda un rol esenţial în patogenia infecţiilor cu stafilococ. Morgan şi Grayon (1936) au descris 2 fracţiuni hemolitice α, destincte antigenic, α_1 şi α_2.

Hemolizina β este elaborată mai ales de stafilococii de origine animală; ea produce o hemoliză de tip „cald-rece" (incubare la 37°, 18—20 de ore, urmată de păstrare la +4° peste noapte).

Este activă mai ales asupra hematiilor de oaie şi bou şi lizează slab pe cele de om, iepure şi cobai. Prin însămînţarea culturii producătoare de hemolizină β pe placă cu geloză-sînge de oaie, după incubare la 37° se obține o zonă de hemoliză incompletă, tulbure, net delimitată, care devine clară numai după păstrare cîteva ore la +4°.

Este antigenic distinctă de hemolizina α și are efect toxic mai redus decît aceasta. Nu este dermonecrotică și arată la iepure efecte letale tardive numai cînd este administrată în doze mari.

Este mai rezistentă la acțiunea căldurii decît hemolizina α. Astfel încălzită la 65°, timp de 30 de minute, pierde doar 30 — 40% din activitate, iar după expunere la 100° 30 de minute păstrează încă 5—10% din toxicitatea ei inițială.

Sub acțiunea formolului se transformă mai greu în toxoid.

S-au descris unele tulpini de stafilococ de origine umană, capabile să elaboreze și hemolizina α și β.

Hemolizina γ, descrisă și studiată de către Smith și Price în 1938, este mai puțin activă asupra globulelor de oaie, lizează hematiile de iepure și tardiv pe cele de șoarece și cobai.

Apare mai puțin stabilă decît hemolizinele α și β. Slab dermonecrotică, produce efect letal la iepure numai în doză mare. Este complet distrusă prin încălzire 30 de minute la 55° și 3 ore la 45° și prezintă o rezistență slabă la acțiunea formolului. Unii autori (Elek și Levy) o asimilează cu hemolizina α_2, alții (Marks) confirmă existența unei toxine separate.

Hemolizina δ, descrisă de Williams și Harper (1947), este distinctă antigenic de precedentele. Acționează asupra hematiilor de om, iepure, cal, oaie, producînd hemoliză la cald (37°), cu linii nete. Este singura dintre hemolizinele stafilococice capabile să lizeze intens eritrocitele de origine umană. Îndeosebi stafilococii aurii izolați din infecții umane s-au arătat producători de hemolizină δ, de obicei alături de cea α. Este dermonecrotică și ar avea legătură cu activitatea leucocidinică.

S-au pus în evidență două fracțiuni δ, una termostabilă la 60° și alta termolabilă.

Gladstone și Van Heyningen au demonstrat rezistența hemolizinei δ chiar la autoclavare la 115°, 20 de minute.

Este solubilă în alcol etilic, eter sau acetonă.

Hemolizina ε a fost descrisă de către Elek și Levy (1950) la stafilococi coagulazonegativi.

Activitatea dermonecrotică a toxinei stafilococice a fost pusă în evidență de către Parker (1924), care a arătat că inocularea pe cale intradermică la iepure a filtratelor culturilor de stafilococ produce o zonă de necroză la locul de inoculare. Efectele necrotice, observate de obicei în asociație cu cele hemolitice și letale, pot exista și independent de acestea. Inocularea intradermic, pe spinarea depilată a iepurilor sau cobailor, a unor doze de 0,005 ml — 0,001 ml dintr-o toxină activă produce leziuni de necroză, care în 48 de ore produc escare detașabile.

S-a pus întrebarea dacă factorul necrotic nu ar avea un rol important în infecțiile stafilococice cu localizare cutanată. Elek (1950) a demonstrat, însă, că prezența germenilor vii este necesară.

Activitatea letală. Kraus și Pribram (1906) au observat și descris efectele letale rapide ale filtratelor unor culturi de stafilococi aurii inoculate pe cale intravenoasă la iepure.

Dingle și colaboratorii (1937) au demonstrat că moartea rapidă (5—30 de minute) cauzată de inocularea pe cale intravenoasă a toxinei stafilococice ar fi produsă prin fibrilație ventriculară. O toxină activă omoară iepurele în doză de 0,2 ml—0,4 ml pe kilocorp.

Leucocidina. Produsă, de majoritatea stafilococilor patogeni, leucocidina este factorul toxic cu acțiune distructivă asupra leucocitelor, în special asupra polimorfonuclearelor neutrofile.

Activitatea leucocidinică se pune în evidență prin metoda biopsică Neisser-Wechsberg, bazată pe proprietatea celulelor vii de a consuma oxigenul, reducînd albastrul de metilen. Adăugînd diluții de filtrat de cultură de stafilococ la amestecul albastru de metilen plus leucocite, se determină cantitativ leucocidina.

S-a căutat să se facă legătura între activitatea leucocidinică și hemolizinele α sau β. Jackson și Little (1957) au sugerat că leucocidina ar fi identică cu hemolizina δ.

Leucocidina ar afecta activitatea metabolică a leucocitelor responsabile de distrugerea și digestia cocilor; este antigenică; administrată la iepuri și cai, stimulează producerea de antileucocidină. Nu se cunoaște rolul leucocidinei în patogenia infecțiilor stafilococice.

Enterotoxina. Entitate distinctă de celelalte fracțiuni toxice constituie elementul cu rol unanim recunoscut în determinarea toxiinfecțiilor alimentare.

Natura enterotoxinei a făcut obiectul a numeroase cercetări. Unii autori o consideră o exotoxină cu proprietăți fizice și chimice bine stabilite. Alții, printre care Dack, Mercier, Hammon, o consideră o toxină incompletă, eventual o enzimă.

Asupra raporturilor enterotoxinei cu celelalte fracțiuni toxice au existat de asemenea opinii variate. Astfel, Slanetz (1942) a sugerat ideea unei identități între enterotoxină și hemolizina β. Trujețki (1949) admite, de asemenea, o relație între activitatea enterotoxică și cea hemolitică.

Totuși o serie de caracteristici deosebesc enterotoxina de celelalte fracțiuni toxice ale stafilococului.

Printre acestea este în primul rînd diferența în comportarea față de căldură. În timp ce hemolizina α este inactivată prin încălzire la 57°, enterotoxina rezistă la 100°, timp de 30 de minute.

Dolman (1943), Fulton (1943) și alții au diferențiat enterotoxina de hemolizinele α și β prin probe biologice. Astfel, pe cînd acestea din urmă, administrate *per os* la voluntari umani, nu produc tulburări, enterotoxina administrată pe aceeași cale provoacă tulburări gastro-intestinale tipice. Pe de altă parte, s-au descris unele tulpini de stafilococ care, deși lipsite de activitate hemolitică, s-au arătat puternic enterotoxice (Dolman, Nestorescu și colaboratorii, Bergdoll).

Stolmakova (1957) a demonstrat, de asemenea, independența activităților hemolitică și enterotoxică în filtratele culturilor de stafilococi enterotoxici.

Totodată, cercetările chimice moderne permit să se considere enterotoxina ca un produs toxic distinct (Thatcher și Matheson, 1955; Bergdoll, 1956). Enterotoxina purificată și supusă metodelor de fracționare a proteinelor prezintă următoarele caracteristici: proteină solubilă în apă, cu greutatea moleculară de 15—25 000 și punct izoelectric la pH aproximativ 8,5, conținînd o proporție mare de lizină. Rezistă la acțiunea acizilor și bazelor, la acțiunea digestiei peptice și triptice.

Enterotoxina este un produs difuzibil în mediu, obținut din culturi pe geloză semilichidă, incubate în atmosferă de CO_2 și filtrate. Rezistă 30 de minute la 100°. Prin fierbere prelungită sau autoclavare își pierde din activitate. Se conservă la gheață, cîteva luni.

Asupra antigenității enterotoxinei au existat, de asemenea, controverse. În 1944, Dolman a reușit să imunizeze oameni prin administrări repetate pe cale subcutantă. Ulterior, Burbianka (1956) și Casman (1958) au demonstrat antigenitatea enterotoxinei prin imunizarea iepurilor, primul cu filtrate enterotoxice, iar al doilea cu produsul concentrat.

Modul de acțiune a enterotoxinei a dat naștere la teorii și ipoteze numeroase. Bayliss (1940), cercetînd pe cale experimentală mecanismul prin care enterotoxina determină reflexul vomei la pisici și iepuri, conchide că aceasta nu ar acționa direct asupra musculaturii netede a intestinului, ci ar excita numai terminațiile nervoase periferice de la nivelul tractului gastro-intestinal, de unde impulsul ajunge, pe calea vagului, la centrul vomei. De aici, impulsul motor ajunge la diafragm pe calea frenicului, la mușchii trunchiului prin nervii somatici și la intestin pe calea sistemului nervos vegetativ.

Activitatea toxică a enterotoxinei este variabilă în raport cu specia animală și cu calea de administrare.

Omul posedă sensibilitatea cea mai mare față de enterotoxină, urmat fiind de maimuță (*Rhesus* și *Mulatta*).

Dintre animalele de laborator pisica, și în special pisoii în vîrstă de 6 săptămîni pînă la 3 luni, răspund prin tulburări gastro-intestinale tipice la administrarea de enterotoxină.

Aceste activități toxice ale filtratelor de stafilococ au făcut pe unii autori (Burnet) să socotească toxina stafilococică ca o toxină unică, cu manifestări toxice multiple. Alții, dimpotrivă, au conceput existența unui amestec de mai multe componente toxice.

Dovada exactității primei ipoteze a fost adusă de cercetările lui Pillemer și Robins, care în toxina stafilococică purificată au pus în evidență trei proprietăți toxice (hemolitică, necrotică și letală).

Anatoxina stafilococică: tratată cu formol în concentrație de 4‰ și păstrată la 37°, timp de 10–14 zile, toxina stafilococică se transformă în toxoid sau anatoxină stafilococică, produs lipsit de toxicitate, care însă își păstrează integral proprietățile antigenice, calități pentru care este folosită în profilaxia și terapia infecțiilor cu stafilococ.

Virulența. Al doilea factor de patogenitate al stafilococilor este virulența, condiționată, la rîndul ei, de prezența unui complex de enzime printre care:

Coagulaza: capacitatea stafilococilor de a coagula plasma a fost descrisă pentru prima oară de către Loeb, în 1903. Ulterior, Munch și alți cercetători au studiat proprietățile coagulazei și mecanismul ei de acțiune. Substanță filtrabilă, coagulaza rezistă sau se distruge doar parțial la 100°, fiind inactivată de enzimele proteolitice.

În 1956, Tager a obținut-o în stare purificată, sub forma unui produs nedializabil, cu 14–16% azot, termolabil, inactivat sub acțiunea tripsinei.

Antigenicitatea coagulazei este scăzută. Totuși Rammelkamp, Bagder și colaboratorii (1950) au reușit să obțină anticorpi specifici în serul maimuțelor, iar Tager și Hales (1948), Duthie și Lorenz (1952) au produs anticorpi la iepuri, prin inocularea produsului purificat sau adsorbit pe fosfat de aluminiu. La noi în țară, Soru și Comoroșan au obținut de asemenea, un ser antistafilocoagulazic la iepure, prin inoculări repetate pe cale intraperitoneală cu produsul purificat și adsorbit pe alaun.

Rammelkamp și colaboratorii (1950), și Duthie (1952) au pus în evidență existența mai multor coagulaze antigenic distincte.

Intervenția coagulazei în mecanismul coagulării plasmei nu este clar elucidată. Coagulaza, împreună cu un component al plasmei — C.R.F. (factor care reacționează cu coagulaza), ar produce o substanță precursoare trombinei, care activează transformarea fibrinogenului în fibrină.

Este astăzi unanim recunoscut că elaborarea de coagulază are un rol important în determinarea patogenității tulpinilor de stafilococ. După Vîgodcikov, 97,6% din stafilococii patogeni coagulează plasma. Smith și Hale (1944) au arătat că susceptibilitatea sau rezistența diferitelor specii animale față de stafilococ este legată de capacitatea plasmei lor de a se coagula sub influența stafilocoagulazei. Producînd o barieră de fibrină, stafilocoagulaza ar avea un rol de inhibare a fagocitozei și dezvoltare a infecției, pînă la intrarea în acțiune a toxinelor.

Fibrinolizina: capacitatea stafilococilor de a digera fibrina a fost descrisă pentru prima oară de către Aoi, în 1932, și ulterior de către alți cercetători, printre care Minett (1936), Neter (1937) etc.

Elaborarea de fibrinolizină este comună mai ales stafilococilor de origine umană; 80—90% din stafilococii coagulazopozitivi sînt și fibrinolitici. Asupra mecanismului de acțiune al fibrinolizinei, Lack (1956) a sugerat ipoteza că organismele ar elabora de fapt o stafilokinază, activator al unei profibrinolizine (plasminogen) și nu propriu-zis o adevărată fibrinolizină.

Sînt cunoștințe foarte reduse asupra rolului fibrinolizinei în patogenia infecțiilor stafilococice.

Hialuronidaza, enzimă cu rol în hidroliza acidului hialuronic, element de bază al țesutului conjunctiv, mărește permeabilitatea țesuturilor, favorizînd difuzarea infecției. Tendința stafilococilor de a produce infecții cu caracter localizat arată că stafilococii sînt slab producători de hialuronidază.

Infecțiile stafilococice la om. Apariția și evoluția infecțiilor produse de stafilococ, ca orice proces infecțios, sînt condiționate, pe lîngă caracterele de agresivitate ale agentului microbian, de proprietățile de apărare sau de gradul de receptivitate a organismului atacat.

Datorită răspîndirii lor largi, stafilococii potențial patogeni pot fi găsiți pretutindeni, proporția indivizilor care poartă în nazo-faringe, pe piele, în conținutul intestinal etc. fiind, după cum s-a arătat, foarte ridicată; numai totuși o parte din acești purtători dezvoltă infecții stafilococice, anumiți factori care țin de gazdă fiind indispensabili.

În general toți factorii care scad rezistența la infecție, afecțiuni intercurente, boli debilitante, tulburări de nutriție (diabet), bolile alergice, favorizează dezvoltarea infecțiilor stafilococice.

Vîrsta intervine de asemenea, copiii şi adolescenţii fiind mai susceptibili.

Anumite stări fiziologice, sarcina, precum şi cauze locale, traumatisme, procese ischemice capabile să slăbească mijloacele de apărare ale organismului, creează condiţii favorabile dezvoltării infecţiei. Este un fapt bine dovedit că omul prezintă o sensibilitate mai mare faţă de stafilococ decît animalele.

Aspectul clinic al infecţiei mai depinde încă de calea de pătrundere a germenilor în organism, de capacitatea lor de răspîndire, de localizarea lor, precum şi de doza infectantă.

Referitor la doza infectantă, Elek (1956) a stabilit doza minimă infectantă capabilă de a produce leziuni în piele la om, care este între 2 şi 7 milioane coci.

Stafilococul poate infecta omul pe cele mai variate căi: calea cutanată, calea mucoaselor, căile aeriene, calea intestinală, tractul genito-urinar etc.

La nivelul pielii produce cele mai variate manifestări, de la pustule simple, la abcese şi furuncule. Din furunculele localizate în regiunea nasului şi a buzei superioare, infecţia se poate răspîndi pe cale venoasă, producînd tromboza sinusului orbitar şi cavernos, cu septicemie consecutivă.

Furunculele localizate pe ceafă şi bărbie, axilă şi fese, constituie, prin caracterul lor recidivant, o problemă deosebită din punct de vedere al tratamentului.

Din abcesul iniţial, infecţia se poate răspîndi pe calea limfatică sau sanguină, dînd septicemii şi piemii cu sau fără localizări metastatice, producînd leziuni de endocardită vegetantă, abcese pulmonare, nefrită supurată, abcese perirenale etc.

Localizările în organe nu sînt totdeauna secundare; ele pot fi şi primare.

În etiologia cistitelor şi pielo-nefritelor, stafilococii ocupă locul al doilea, după *Esch. coli*. De asemenea, stafilococii sînt frecvent semnalaţi în asociaţie cu alţi germeni patogeni sau condiţionat patogeni în infecţiile viziculei biliare şi ale apendicelui.

La nivelul căilor aeriene pot produce diferite angine, infecţii bronşice, infecţii pulmonare, care la copiii mici evoluează ca bronhopneumonii adesea fatale, iar la adulţi, cu tendinţă la formare de abces pulmonar.

Prin extinderea unui proces infecţios din urechea medie ori sinusul nazal, pot avea loc localizări la nivelul meningelor sau chiar abces cerebral.

O considerabilă majoritate, după unii chiar 90% din cazurile de osteomielită, au etiologie stafilococică.

Infecţia puerperală, provocată de obicei de streptococi, poate cunoaşte şi originea stafilococică. Infecţiile stafilococice, la nou-născuţi şi sugari, caracterizate printr-o evoluţie severă, cu tendinţa spre generalizare şi mortalitate ridicată, ca şi mastitele sînt deseori întîlnite.

Ingerarea unor alimente contaminate cu stafilococi enterotoxici poate provoca fenomene de toxiinfecţie alimentară. Toxiinfecţiile cu stafilococ constituie categoria de toxiinfecţii alimentare, de tip toxic, caracterizate prin perioada scurtă de incubaţie, predominanţa simptomelor digestive, absenţa febrei şi a fenomenelor generale, evoluţie scurtă (24—48 de ore) şi prognostic benign.

O entitate patologică distinctă o constituie enterita stafilococică postantibiotică, boală care poate apărea la bolnavi tratați cu substanțe antibiotice pe cale orală sau parenterală. Administrarea antibioticelor pe cale intravenoasă (tetracicline) provoacă o concentrare de antibiotice în lumenul intestinal de zece ori mai mare decît după administrare pe cale orală, ceea ce cauzează reprimarea florei normale a intestinului, favorizînd multiplicarea stafilococilor antibioticorezistenți (Lundsgaard, 1960). Acest sindrom, caracterizat prin tulburări gastrointestinale sau de sistem (diaree, vărsături, deshidratare, stare de șoc, oligurie, azotemie — moarte), este cauzat de stafilococi antibioticorezistenți (proveniți fie din organismul însuși, fie din mediul înconjurător, personal de spital etc.) care, invadînd tractusul digestiv, lipsit de floră, se multiplică în intestin, elaborînd toxina.

Infecția spontană la animale. Animalele sînt în general mai rare afectate de stafilococii. Singur sau în asociație, stafilococul auriu a fost semnalat în diferite procese patologice, dar mai ales în mamitele cailor, vitelor și oilor. Tulpini de stafilococ auriu și alb au fost izolate de asemenea din abcese spontane la păsări.

Infecția experimentală. Dintre animalele de laborator, mai sensibili la infecția experimentală cu stafilococ sînt iepurii. Calea intravenoasă reprezintă modul cel mai sigur de infectare. Inocularea pe această cale a unei cantități de 0,1 ml cultură în bulion, în vîrstă de 24 de ore, produce o septicemie mortală cu localizări în organe, cu formare de microabcese, mai ales la nivelul rinichiului și miocardului. Inocularea pe cale intraperitoneală produce de asemenea o infecție mortală. Inocularea pe cale intramusculară sau subcutanată produce abcese localizate.

Șoarecele răspunde infecției experimentale mai puțin uniform și sigur decît iepurele. Pentru cercetarea virulenței tulpinilor s-au căutat diferite modele experimentale. Calea de administrare cea mai des folosită este calea intraperitoneală. Rezultatele obținute sînt însă inconstante și nu totdeauna în concordanță cu patogenitatea pentru om și cu testele de patogenitate *in vitro*.

V. Ștefănescu și colaboratorii (1958) au determinat patogenitatea tulpinilor de stafilococ prin administrare pe cale intrapleurală, la șoareci de 18—22 g, a unei cantități de 0,2 ml cultură în bulion, de 18—20 de ore, cu observație de 24 de ore. Cu această metodă autorii au obținut moartea animalelor la 90% dintre tulpinile proaspăt izolate, care se arătau patogene în raport cu testele clasice *in vitro*. Stafilococii nepatogeni nu omoară șoarecii pe această cale. Cobaiul este relativ rezistent, șobolanul și porumbelul sînt foarte rezistenți.

Imunitate. În raport cu mecanismul de producere și cu caracteristicile ei, imunitatea în infecțiile stafilococice poate fi naturală sau dobîndită. Așa cum s-a arătat, cu toată larga răspîndire a stafilococilor, cu toate multiplele posibilități de contaminare, nu toți oamenii dezvoltă infecții stafilococice, ceea ce arată că anumiți factori intervin în producerea procesului infecțios. Blair (1958) atrăgea atenția în mod deosebit asupra importanței factorului gazdă în dezvoltarea infecțiilor stafilococice. Se știe că în mecanismul de producere a imunității naturale, pielea și mucoasele au un rol important de apărare. În cazul stafilococului, bariera cutanată nu este prea solidă. Experiența clasică a lui Garré, confirmată și de alți cercetători, a dovedit posibilitatea pătrunderii stafilococilor chiar prin pielea sănătoasă. Mai mult decît atît, pielea se pare că prezintă chiar o receptivitate particulară, ceea ce explică frecvența și multitudinea aspectelor clinice ale infecțiilor cutanate, produse de stafilococi.

Aparatul fagocitar, care prin procesul inflamator tinde să localizeze infecția, imprimă leziunilor caracterul focal.

Prin intermediul leucocidinei, după cum s-a arătat, stafilococii exercită o acțiune nocivă asupra polimorfonuclearelor neutrofile.

Factorii umorali contribuie și ei la apărarea naturală a organismului.

În ce privește imunitatea dobîndită, trebuie luată în considerație, pe de o parte, imunitatea antitoxică și, pe de alta, imunitatea antimicrobiană.

Organismul elaborează anticorpi specifici împotriva fiecăreia din fracțiunile toxice produse de agentul microbian. Împotriva hemolizinei α, organismul elaborează antihemolizina α. Cercetîndu-se prezența antihemolizinei α în ser, în diferite infecții, s-au găsit titruri crescute (10 U/ml) în septicemii, osteomielite, abcese musculare profunde, în timp ce în infecțiile superficiale, infecții cutanate, localizări otice, meningiene etc. titrul nu depășește 2–3 U/ml.

La oameni normali, fără infecții stafilococice, titrul este jos, variind în funcție de infecțiile stafilococice aparente sau inaparente anterioare între 0,1 și 1 U/ml.

D'Antona (1959) arată că la organismele suficient de bogate în antitoxină α crește și activitatea opsoninelor și activitatea antiletală etc.

Împotriva sistemului de enzime care condiționează virulența germenului, organismul se apără printr-o imunitate antimicrobiană.

Stimularea producerii de anticorpi poate fi realizată și în mod artificial. Astfel, prin administrare de anatoxină stafilococică se obține elaborarea de antitoxină α. Aceasta apare cam la o săptămînă de la prima inoculare, iar titrul maxim atins, după un ciclu întreg de imunizare, rămîne stabil cîteva săptămîni, după care scade treptat. Asupra nivelului minim de antitoxină necesară pentru asigurarea unei bune apărări contra infecției, după majoritatea autorilor acesta ar fi de 5–10 U/ml.

Stimularea imunității antimicrobiene se obține prin administrare de vaccin antistafilococic.

În sfîrșit, un element de care trebuie să se țină seama este starea de hipersensibilitate a organismului față de proteinele stafilococice, manifestată prin variate simptome alergice, generale și locale, care vin să complice mai mult mecanismul și, prin aceasta, manifestarea clinică a infecțiilor cu stafilococi.

Tratament specific. Printre produsele biologice care stimulează imunitatea antitoxică, se situează, așa cum am arătat, în primul rînd anatoxina stafilococică. Acest produs, fie că este vorba de anatoxină nativă, fie de cea concentrată și purificată, este folosit în scop terapeutic. Recent, unii cercetători (Johanowski, 1959) au experimentat, cu bune rezultate, imunizarea gravidelor în scop preventiv, la cîteva săptămîni înainte de naștere. Administrarea produsului se face pe cale subcutanată, la 3–4 zile interval, începînd cu cantități foarte mici (1/100 ml), crescînd dozele (0,1; 0,2; 0,4–1 ml) în raport cu toleranța individului.

Un alt produs care stimulează imunitatea antitoxică, de data aceasta în mod pasiv, este serul antistafilococic. Preparat pe cai, prin inoculări repetate de anatoxină şi apoi de toxină, serul antistafilococic este un ser antitoxic, posedînd proprietăţi antihemolitice, antinecrotice, antiletale. Indicaţia majoră a administrării serului antitoxic cu efect terapeutic net, singur sau în asociaţie cu antibioticele, o constituie stafilocociile septicemice grave cu stare de intoxicaţie profundă.

Vaccinurile stafilococice sînt produse biologice folosite pentru a conferi organismului imunitate antimicrobiană :

a) Stockvaccinul (vaccinul stafilococic polivalent) este o suspensie microbiană omorîtă prin căldură (o oră la 60°), conţinînd 1 000 000 000 germeni/ml, preparat cu amestec de tulpini izolate din procese patologice.

b) Autovaccinul este un vaccin preparat după aceeaşi metodă, folosind însă tulpina de stafilococ, izolată de la bolnavul respectiv,ceea ce îi conferă o eficacitate mai mare.

Ambele produse sînt administrate pe cale subcutanată la 3—4 zile interval, începînd cu doze mici, care cresc treptat, în raport cu susceptibilitatea individului.

Asocierea anatoxinei cu vaccinul stafilococic s-a dovedit favorabilă în tratamentul infecţiilor stafilococice.

Longhin şi Antonescu (1957) au obţinut în stafilodermiile cronice, recidivante, 55% vindecări, folosind stockvaccin, asociat sau nu cu anatoxină.

c) Bacteriofagul antistafilococic dovedeşte o oarecare activitate numai cînd este aplicat local (infecţiile căilor urinare, infecţii cutanate, infecţiile plăgilor, arsurilor etc.).

Diagnosticul de laborator

Dată fiind eterogenitatea antigenică pe care o prezintă stafilococii, decelarea anticorpilor în ser nu poate da indicaţii valabile, diagnosticul de laborator al infecţiilor stafilococice fiind, în esenţă, un diagnostic bacteriologic, bazat pe izolarea germenului din produsele patologice. Pe de altă parte, luînd în considerare manifestările foarte variate ale stafilococilor de la saprofitismul cel mai larg, la parazitismul cel mai strict, nu este suficient a izola stafilococul dintr-un produs patologic pentru a-l eticheta drept agent cauzal al infecţiei respective, ci este necesar să i se stabilească şi potenţialităţile de patogenitate, prin teste *in vitro* şi *in vivo*.

Produse de examinat şi condiţiile de recoltare. Fiind germeni atît de larg răspîndiţi, recoltarea produselor în vederea diagnosticului bacteriologic trebuie făcută cu toată atenţia, evitînd contaminarea cu stafilococi din mediul extern :

— puroiul din leziunile deschise se recoltează cu ajutorul tampoanelor sterilizate în prealabil ;

— puroiul din abcese nedeschise este extras cu seringa sterilă după aseptizarea pielii regiunii respective, după care este introdus într-o eprubetă sterilă ;

— sîngele, în vederea hemoculturii, este extras de asemenea cu seringa sterilă din vena plicii cotului, după aseptizarea pielii ;

— exsudatele rino-faringiene sînt recoltate cu ajutorul tampoanelor sterilizate ;

— probele de materii fecale, vărsăturile, se recoltează în mod steril, în recoltoare sau alte recipiente sterilizate în prealabil şi ermetic închise;

— probele de alimente se recoltează după agitare energică dacă alimentul este lichid, şi din diferite regiuni dacă este solid, de asemenea în recipiente sterile şi bine acoperite;

— probele de organe de la cadavre se recoltează în mod aseptic, cu instrumente sterile.

Condiţii de transport. Probele o dată recoltate, trebuie transportate la laborator cu maximum de urgenţă, în condiţii de refrigerare şi însoţite de fişa completă.

Examinarea probelor. Puroiul: se notează aspectul macroscopic al puroiului; se confecţionează frotiuri care se fixează şi se colorează prin metoda Gram.

Se fac însămînţări pe medii de cultură. Dacă puroiul provine dintr-un abces nedeschis, însămînţarea se face în bulion şi pe geloză. Dacă însă el provine dintr-o leziune deschisă, deci cu floră secundară, trebuie folosite medii de îmbogăţire şi de izolare hiperclorurate, care permit izolarea stafilococului în stare pură, majoritatea celorlalţi germeni microbieni netolerînd cantităţi mari de sare în mediile de cultură.

Se obţin rezultate bune prin folosirea următoarelor medii, a căror formulă de preparare o indicăm mai jos.

Mediul de îmbogăţire hiperclorurat

Extract de carne	4 g	Lactoză	15 g
Proteose peptonă	10 g	Bacto-agar pulbere	1 g
Clorură de sodiu	150 g	Apă distilată	1 000 ml

Se dizolvă substanţele la cald, în afară de lactoză. Se aduce mediul la pH 7,6 şi se autoclavează la 120°, timp de 20 de minute, după care se filtrează prin vată. Se adaugă lactoza. Se repartizează cîte 10 ml în tuburi mari şi se sterilizează la autoclav la 110°.

Mediul solid hiperclorurat (Chapman)

Extract de carne	4 g	Manită	10 g
Proteose peptonă (poate fi folosită şi altă peptonă)	9 g	Agar fibre	20 g
Clorură de sodiu	75 g	Roşu de fenol, pulbere	0,025 g
		Apă distilată	1 000 ml

Se dizolvă substanţele la cald, afară de manită şi roşu de fenol, care se adaugă la urmă.

Se aduce mediul la pH 7,6. Se autoclavează, pentru precipitare, la 120°, timp de 20 de minute, după care se filtrează prin vată. După filtrare se încorporează manita şi roşul de fenol, se repartizează în balonaşe sau sticluţe şi se sterilizează la 110°, timp de 20 de minute. La nevoie, mediul se topeşte prin încălzire la baia de apă, după care este turnat în plăci Petri. Plăcile sînt apoi uscate la 37°, fie o jumătate de oră cu capacul întredeschis, fie 18—20 de ore cu capacul închis. Mediul neînsămînţat are o culoare roz-gălbuie.

Puroiul este suspensionat în apă distilată. Se însămînţează suspensia de produs într-un volum egal de mediu de îmbogăţire hiperclorurat.

După o incubare de 36 de ore la 37°, se efectuează o trecere pe mediul Chapman, cu însămînțare în striuri, pînă la epuizare, pentru a se obține colonii izolate.

Citirea plăcilor se face după 24 de ore sau 48 de ore la 37°. Stafilococii care fermentează manita dezvoltă colonii galbene, iar cei manito-negativi, colonii roz-roșcate.

Sîngele (hemocultura). Se însămînțează sîngele în bulion simplu, în proporție de maximum 10%. În cazurile tratate în prealabil cu penicilină se adaugă bulionului de cultură o cantitate de penicilinază (1—2 ml filtrat de cultură de *Esch. coli* în bulion în vîrstă de 6—7 zile, sau conținutul unei fiole de penicilinază purificată și liofilizată capabilă să desfacă cel puțin 200 unități penicilină, într-o oră, la 37°), spre a anihila acțiunea împiedicătoare a penicilinei.

La cei tratați cu streptomicină, bulionului de cultură i se adaugă cisteină (5—6 mg anulează acțiunea unei cantități de 100 γ streptomicină), iar la cei tratați cu sulfamide, acid paraaminobenzoic (1/10 000 — — 1/100 000).

După incubare de 24 de ore la 37°, se face o primă trecere pe geloză înclinată, după care mediile însămînțate, ca și bulionul de origine sînt incubate 24 de ore la 37°.

În caz de rezultat negativ, trecerile pe geloză se repetă la interval de 24 de ore, cu urmărire de minimum 7 zile.

Exsudatele rino-faringiene conținînd floră asociată, recoltate pe tampoane, se însămînțează în mediul hiperclorurat de îmbogățire, prin introducerea tamponului în mediul diluat 1/2 cu apă distilată. După incubare 36 de ore la 37°, se face dispersiune pe mediul solid hiperclorurat, restul examenului decurgînd la fel ca la examinarea puroiului.

Probele de materii fecale și vărsături sînt suspensionate în apă distilată, după care se adaugă la un volum egal de mediu hiperclorurat de îmbogățire, urmînd apoi ceilalți timpi ai examenului.

Probele de alimente: după notarea aspectului macroscopic, se confecționează frotiuri prin impresiune, care se colorează prin metoda Gram.

Pentru izolarea stafilococului se iau fragmente, care se triturează și se suspensionează în apă distilată, iar dacă alimentul este lichid, se suspensionează de asemenea în apă distilată, după care se însămînțează într-un volum egal de mediu de îmbogățire hiperclorurat.

Probele de organe. Se folosește o tehnică similară cu cea expusă mai sus.

O dată obținut stafilococul în cultură pură, oricare ar fi produsul examinat, urmează în mod obligatoriu cercetarea *caracterelor de patogenitate* prin teste *in vitro*, și anume:

a) *Producția de pigment* se apreciază pe medii cu geloză 2% și ser coagulat de bou. Pigmentul apare mai ales la temperatura de 22—25°, după 48 de ore.

b) *Fermentarea manitei*. Însămînțările se fac în apă peptonată care conține 1% manită, în prezența turnesolului sau a albastrului de bromtimol.

c) *Prezența coagulazei*. Se recoltează pe 1 ml soluție de oxalat de sodiu sau de potasiu 2%, prin puncționarea unei vene, 9 ml sînge de om, sau 9 ml sînge de iepure prin puncţionarea inimii acestui animal. Se centrifughează şi se decantează plasma; aceasta se distribuie cîte 0,3 ml în tuburi de hemoliză, peste care se adaugă 0,2 ml cultură de stafilococ, în vîrstă de 24 de ore, în bulion. Se incubează la 37° timp de 4 ore, citindu se la fiecare jumătate de oră. Se prepară totdeauna un martor în care, în loc de cultură, se adaugă 0,3 ml ser fiziologic, precum şi cîte un martor însămînţat cu un stafilococ sigur coagulază-pozitiv şi coagulază-negativ.

Se poate folosi şi plasmă diluată 1/10. Diluţia se prepară cu o soluţie 9‰ de ClNa (chimic pur). La 1 ml plasmă diluată 1/10 se adaugă 2 picături de cultură în bulion.

Pentru examinări în masă, Blair recomandă testul pe lamă: pe o lamă curată se depune o picătură de apă distilată, în care se suspensionează o ansă de cultură. Se adaugă o picătură de plasmă. În cazul unei reacţii pozitive, în 15—60 de secunde apare o coagulare vizibilă.

d) Cercetarea fibrinolizinei. Sub acţiunea fibrinolizinei, fibrina produsă de coagulază se lichefiază după 24 de ore. Fibrinolizina se pune în evidenţă în felul următor: la 7 părţi geloză 2%, topită şi răcită la 50°, se adaugă o parte plasmă oxalatată. Amestecul este încălzit la 56°, timp de 5 minute, şi turnat în plăci Petri. Se însămînţează stafilococul de cercetat, pentru a se obţine colonii izolate; se incubează o noapte la 37°. În jurul culturilor producătoare de fibrinolizină se constată o zonă clară.

e) Hemolizina. La 100 ml geloză 2% topită şi răcită la 55° se adaugă 5 ml sînge defibrinat de iepure. Se toarnă în plăci Petri. Se însămînţează stafilococul în arii sau în striuri. Se incubează plăcile 24 de ore la 37°. Pot apărea: a) zone de liză, cu marginea nedeterminată (hemolizina α); b) zone întunecate în jurul coloniei (hemolizina β), care se clarifică prin păstrarea la gheţar (liză de tip „cald-rece").

Determinarea *in vitro* a sensibilităţii faţă de antibioticele folosite în clinică se face după una din metodele descrise la capitolul antibiotice.

În cazul toxiinfecţiilor alimentare, pentru stabilirea etiologiei stafilococice, este necesar a se pune în evidenţă producerea de enterotoxină de către stafilococii izolaţi.

Prepararea enterotoxinei stafilococice. Se foloseşte ca mediu de cultură macerat de viţel, la care se adaugă peptonă 2 g‰, glucoză 1 g‰, maltoză 2 g‰, sulfat de magneziu 0,3 g‰, agar 7 g‰, fosfat bipotasic 1 g‰ şi fosfat monopotasic 1 g‰; pH 7,5. Se cultivă stafilococul de cercetat pe mediul turnat în plăci Petri, care sînt apoi incubate 48 de ore la 37° în atmosferă conţinînd 20% bioxid de carbon (în exicator). Ulterior se taie mediul cu cultură cu ajutorul unei spatule şi se filtrează prin pîlnie cu tifon, la gheţar, peste noapte.

Produsul obţinut este centrifugat, iar supernatantul filtrat prin filtru de azbest (Seitz).

Filtratul obţinut conţine toate fracţiunile toxice, inclusiv enterotoxina în cazul stafilococilor enterotoxici. Pentru separarea enterotoxinei de celelalte fracţiuni toxice, în mod obişnuit se foloseşte fierberea, timp de 20—30 de minute, enterotoxina fiind mai rezistentă la acţiunea căldurii decît celelalte fracţiuni toxice.

Precipitatul obţinut prin fierbere este îndepărtat prin centrifugare supernatantul fiind folosit pentru testul biologic.

Dintre animale, cu o reactivitate mai apropiată de aceea a omului s-au dovedit a fi maimuţele Rhesus şi Mulatta. Testul pe pisoi, descris de Dolman şi colaboratorii, rămîne cel mai accesibil. Se folosesc pisoi de 350—750 g, în vîrstă de 6—8 săptămîni, cărora li se administrează, pe cale intraperitoneală, produsul de cercetat, încălzit la 37°, în doză de 1—3 ml/kilocorp.

Apariţia la interval de 15—30—60 de minute a unei stări de somnolenţă sau, dimpotrivă, de nelinişte, tulburări gastrointestinale manifestate prin sialoree, regurgitaţii, contracţia muşchilor abdominali, vărsături şi diaree. După faza acută, animalele rămîn cîteva ore cu stare de apatie, oboseală, după care îşi revin. Moartea animalelor nu survine decît excepţional.

Ca martori trebuie folosite animale inoculate în condiţii similare cu filtrat din acelaşi mediu, dar neînsămînţat, şi animale inoculate cu filtrat sigur enterotoxic.

Acelaşi animal poate fi folosit de mai multe ori, la interval de 7—10 zile.

În locul pisoilor se pot folosi şi pisici tinere, de 1 kg greutate, care trebuie însă inoculate pe cale intravenoasă sau intracardiacă, în doză de 1—4 ml/kilocorp.

Epidemiologie

Epidemiologia infecţiilor cu stafilococ îmbracă, în ultima vreme, aspecte cu totul noi. După atîţia ani de folosire intensivă a antibioticelor, una din problemele care domină epidemiologia infecţiilor stafilococice este rezistenţa căpătată a germenilor faţă de aceste substanţe. Capacitatea stafilococilor de a produce variante rezistente este remarcabilă în comparaţie cu alte specii microbiene şi pare a fi nelimitată. Incidenţa stafilococilor antibioticorezistenţi a mers crescînd de la an la an, mai ales în mediul spitalicesc. Dacă în populaţia generală, în afara spitalului, proporţia de stafilococi penicilinorezistenţi este de circa 10—15%, în mediul de spital aceasta ajunge la 60—75%, sau chiar mai mult.

Problema infecţiilor intraspitaliceşti cu stafilococi antibioticorezistenţi este în special acută în maternităţi şi spitale de copii. Nou-născutul se infectează curînd după naştere. Nestorescu şi colaboratorii au găsit purtători printre nou-născuţi, după 3—4 zile de viaţă.Pe de altă parte, se pare că nou-născutul şi copilul mic au o receptivitate particulară faţă de stafilococ, dezvoltînd infecţii cu alură gravă, cu punct de plecare de la sistemul cutanat sau căile aeriene.

Alături de infecţiile stafilococice ale nou-născutului, altă problemă acută a maternităţilor, o constituie incidenţa crescută a *mastitelor*.

O altă manifestare patologică a stafilococilor rezistenţi la antibiotice este *enterita stafilococică postantibiotică*, entitate clinică de o deosebită gravitate, adesea mortală, care se semnalează uneori, în urma administrării intensive a antibioticelor, în special după traumatismele chirurgicale mari, în operaţii pe cord, plămîn etc. Invadarea tractului intestinal, a cărui floră a fost suprimată de terapia antibiotică, prin stafilococi anti-

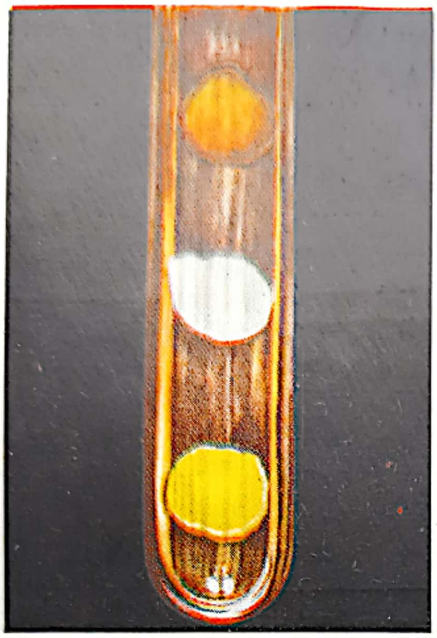


Fig. 84. — Pigmentogeneza la stafilococ.

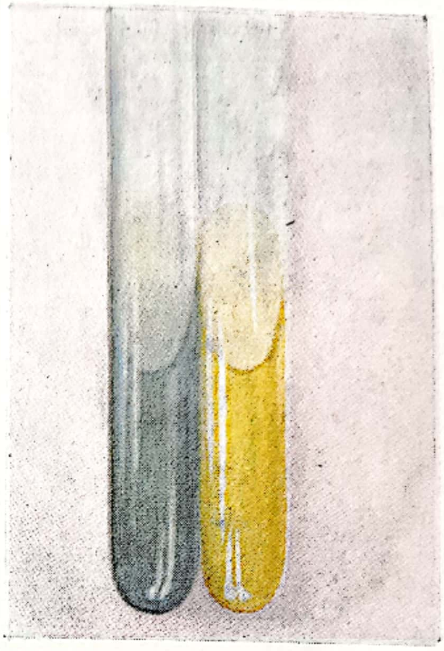


Fig. 85. — Fermentarea manitei (virarea mediului din verde în galben).

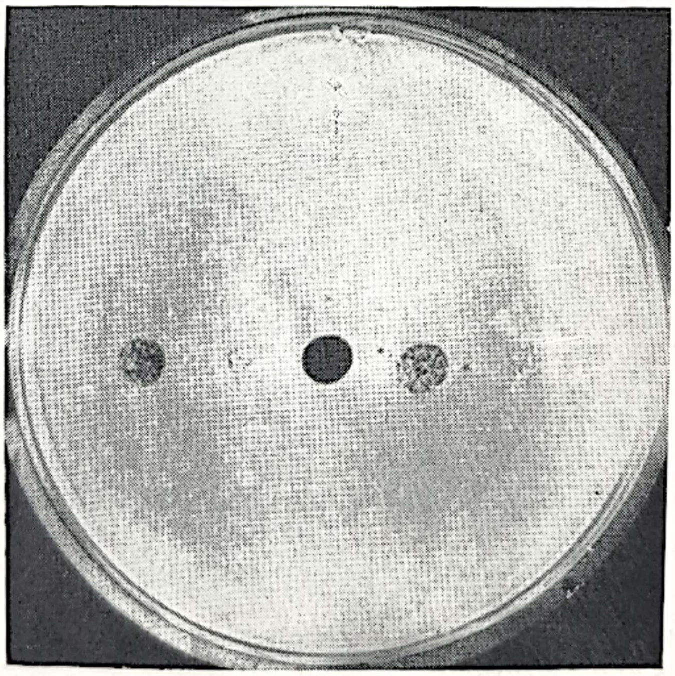


Fig. 86. — Lizotipie stafilococ: grup II; lizotip 3C/3/A55/71.

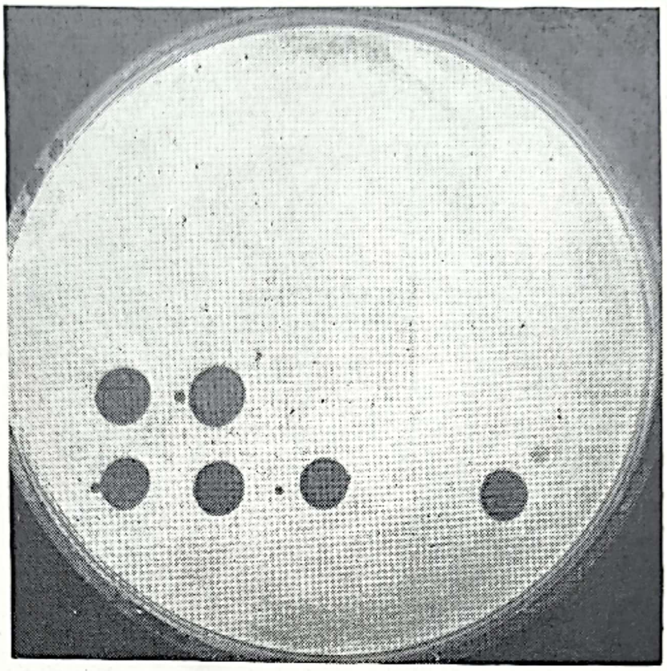


Fig. 87. — Lizotipie stafilococ: grup III, lizotip 47/53/54/73/75/77.

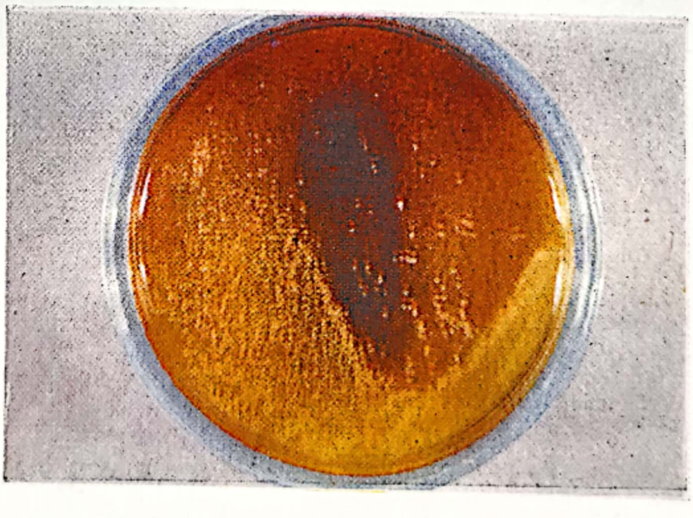


Fig. 88. — Colonii de stafilococ manito-pozitive, pe mediul Chapman.

bioticorezistenți, stă la baza apariției acestui sindrom, care numai printr-un diagnostic și tratament precoce, folosind antibiotice active pentru stafilococul cauzal, poate fi combătut.

De un interes epidemiologic deosebit, apar în fine izbucnirile de toxiinfecții alimentare cauzate de ingerarea unor alimente infectate cu stafilococi enterotoxici. Toxiinfecțiile alimentare produse de stafilococ îmbracă, atît prin manifestările clinice, cît și prin mecanismul de producere, aspectul toxiinfecțiilor de tip toxic, în care elementul activ îl reprezintă enterotoxina elaborată de stafilococ, în aliment.

Dacă stafilococilor izolați astăzi nu li s-a putut demonstra o virulență mai mare decît în trecut, ei dovedesc în schimb o remarcabilă capacitate de difuzibilitate, care imprimă aspectul epidemic al infecțiilor pe care le provoacă (Nestorescu, Popovici și colaboratorii, 1958).

Datorită întinsei răspîndiri a acestor germeni, omul trăiește în permanență într-un mediu continuu contaminat. Sursa principală de infecție, oricare ar fi manifestările ei, rămîne omul bolnav și mai ales purtătorul sănătos.

Rolul purtătorilor sănătoși printre personalul de spital, care după unele statistici ajung la 76,4% (Vogelsang, 1953), este astăzi unanim recunoscut în întreținerea infecțiilor intraspitalicești.

Rolul purtătorilor printre mînuitorii de alimente în generarea toxiinfecțiilor alimentare cu stafilococ este de asemenea amplu demonstrat.

Pentru studiul tulpinilor izolate de la bolnavi și purtători, în scopul decelării originii epidemiei și stabilirii filiației contaminărilor, s-au căutat diferite metode de diferențiere a germenilor. Astfel, rînd pe rînd, s-a recurs la studiul caracterelor biochimice, de patogenitate, la comportarea față de antibiotice, la clasificările serologice.

Nici una nu a dat însă satisfacție nevoilor epidemiologice. Singura metodă de diferențiere, capabilă, în stadiul actual al cunoștințelor, să furnizeze indicații valabile în descoperirea sursei de infecție, stabilirea mecanismului de apariție a epidemiilor ca și privitoare la măsurile ce trebuie luate pentru combaterea acestora, rămîne lizotipia.

Lizotipia stafilococilor. Pentru diferențierea stafilococilor în raport cu sensibilitatea lor la bacteriofagi, se folosesc actualmente cele 21 de preparațiuni fagice, constituind setul de bază, la care se pot adăuga și unii fagi adiționali.

Tulpina de cercetat este cultivată în bulion la 37°. Cultura, în vîrstă de 3 ore, este întinsă pe suprafața unei plăci Petri, conținînd agar 2%, excesul de cultură fiind ridicat cu o pipetă Pasteur. După ce agarul a absorbit cultura, în dreptul ariilor desenate în prealabil pe fundul plăcii se depun, cu ansa sau cu pipeta Pasteur efilată, picături din preparatele de fagi. După uscare, plăcile sînt incubate peste noapte la 30° sau timp de 5–6 ore la 37° și apoi, peste noapte, la temperatura camerei, după care se face citirea. Aceasta se execută cu o lupă de 8–10 diametre.

Notarea reacțiilor se face după următoarele criterii :

Cl = liză confluentă
SCL = liză semiconfluentă
+++ = foarte numeroase plaje izolate
++ = peste 50 de plaje
+ = 20–50 plaje
± = sub 20 de plaje

În cazul în care tulpina nu este sensibilă la nici unul din fagii folosiți la „diluția test”, se repetă lizotipia cu fagi de 1 000 de ori mai concentrați (1 000 × RTD). Dacă și de această dată se obține rezultat negativ, tulpina respectivă este etichetată ca netipabilă.

Datorită multiplelor reacții încrucișate între tipuri (reacții *pattern*), fiecare tulpină trebuie notată cu toate reacțiile puternice (minimum + +) pe care le prezintă față de diferitele preparații fagice. Identitatea reacțiilor fagice indică originea comună a tulpinilor de stafilococ.

Cu ajutorul acestei metode s-au efectuat numeroase studii și s-au soluționat multe din necunoscutele epidemiologiei infecțiilor cu stafilococ. La noi în țară Nestorescu, Popovici și colaboratorii, într-o serie de cercetări, au stabilit tipul de stafilococ predominînd în maternități, spitale de copii mici și în procesele infecțioase în general (tipul 80); au demonstrat capacitatea particulară de difuzibilitate a acestui lizotip; au pus în evidență deosebiri în distribuția lizotipurilor în raport cu profilul unității spitalicești considerate, în raport cu produsul examinat, cu felul leziunii etc., și au demonstrat raporturile dintre sensibilitatea fagică și rezistența la antibiotice.

Problema infecțiilor stafilococice cu aspect epidemic constituie o problemă de sănătate publică de mare actualitate, ca efect al utilizării intensive și deseori abuzive a antibioticelor.

Genul Micrococcus

Cuprinde germeni de formă rotundă sau ovoidă, imobili, așezați perechi, tetrade sau grupuri, în genere gram-pozitivi, aerobi sau anaerobi. Speciile aerobe cresc ușor pe medii de cultură, au capacități fermentative reduse și sînt de obicei lipsite de patogenitate pentru om și animale.

Micrococcus tetragenus, specie descrisă pentru prima oară de către Gaffky, în 1883, a fost izolat de Koch, din caverne tuberculoase.

Avînd formă de coc, adesea încapsulat, tetragenul prezintă o dispoziție caracteristică în tetrade.

Crește pe mediile obișnuite de cultură, dezvoltînd în bulion un depozit gros, gleros, iar pe geloză colonii albe, cremoase, destul de aderente la mediu.

Aerob și anaerob facultativ, se dezvoltă în condiții optime la 37°. Nu lichefiază gelatina, nu coagulează laptele, nu reduce nitrații, fermentează o serie de zaharuri, printre care glucoza, lactoza, zaharoza și maltoza.

În genere lipsit de patogenitate, este întîlnit ca saprofit în căile aeriene superioare. Ca germen de asociație poate fi observat în diferite afecțiuni respiratorii.

Rareori a fost semnalat în septicemii, meningite.

Este patogen pentru șoarece. Inocularea de cultură pe cale subcutanată sau intraperitoneală determină septicemie mortală, cu moarte în 1—8 zile.

Genul Sarcina

Cuprinde de asemenea organisme în formă de coc, dispuse însă sub formă de pachete cubice, diviziunea celulelor făcîndu-se după diametre în trei planuri.

Sarcina ventriculii, descrisă de Goodsir în conținutul stomacului la un bolnav cu o afecțiune gastrică, este considerată ca specia tip.

Avînd formă de coci sferici, prezintă dispoziția caracteristică genului, în pachete cubice, în culturi de bulion, putînd apărea și în perechi sau grupuri mici. Imobil, este gram-pozitiv.

Crește cu ușurință pe medii de cultură. Tulbură bulionul cu depozit vîscos. Pe geloză dezvoltă colonii rotunde, opace, pigmentate în galben pal, de consistență vîscoasă, ușor detașabile de mediu.

Are proprietăți enzimatice foarte reduse, nu fermentează nici un zahăr; nu are acțiune hemolitică, sau proteolitică, nu reduce albastrul de metilen.

Elaborarea de pigment se efectuează în condiții optime la 22°, în timp ce temperatura optimă de creștere este între 22 și 30°.

Nu prezintă patogenitate nici pentru om nici pentru animale.

Sarcina lutea, organism saprofit, răspîndit în aer, sol și apă, are caractere morfologice asemănătoare cu *Sarcina ventriculii*. Pe agar dezvoltă colonii pigmentate în galben citrin. În bulion formează un sediment abundent, fără să tulbure mediul. Temperatura optimă de dezvoltare este la 25°.

Genul Streptococcus şi infecţiile streptococice

Dr. Coralia Baldovin-Agapi *

Familia: *Lactobacillaceae.* Tribul: *Streptococceae.* Genul: *Streptococcus.* Specia: *Streptococcus pyogenes.*

Sub denumirea de streptococi se cuprind specii foarte variate de germeni, caracterizaţi prin dispoziţia celulelor în formă de lanţ. Există specii patogene pentru om şi animale responsabile de o mare varietate de afecţiuni, precum şi specii saprofite. Prezenţa lor ubicvitară este strîns legată de existenţa omului şi a animalelor.

O clasificare a genului *Streptococcus* este foarte dificilă. Dintre toate încercările, clasificaţia lui Sherman pare cea mai cuprinzătoare. El împarte acest gen în 4 mari categorii:

1) streptococii piogeni, din care fac parte toate speciile patogene pentru om şi animale;
2) streptococii *viridans*;
3) streptococii lactici;
4) enterococii.

Istoric. Au fost descrişi pentru prima dată, în cazurile de erizipel, de Billroth (1874) care le-a dat şi numele, iar Pasteur (1878 – 1879) i-a întrevăzut ca agenţi ai febrei puerperale. Koch (1881) i-a găsit în mod constant în fragmentele de piele excizate de la cazurile de erizipel şi Ogston (1881) în procese supurative. Fehleisen (1882 – 1883) a reprodus boala cu ajutorul unei culturi pure, izolată din erizipel (*Streptococcus erisipelatis Fehleisen*). Rosenbach (1884) are meritul de a fi diferenţiat streptococii piogeni de alţi streptococi, denumindu-i *Streptococcus pyogenes.* Klein (1885 – 1886) a adus dovezi bacteriologice, clinice şi epidemiologice privind rolul lor în scarlatină (*Streptococcus scarlatinae*). Streptococul piogen al gurmei cailor a fost descris de Schutz (1888).

În ţara noastră, Babeş (1885) a pus în evidenţă, în mod constant, streptococi în rinichii bolnavilor de scarlatină.

---

* Text revăzut şi adnotat de dr. Florica Mihalcu.

Habitat. Cavitatea bucală, faringele, tractusul intestinal și căile genitale ale omului și animalelor constituie habitatul natural al majorității speciilor cunoscute de streptococi. Unele specii trăiesc în lapte, iar altele sînt întîlnite în sucurile vegetale fermentescibile.

Caractere morfologice. În produse patologice și în medii de cultură favorabile, streptococii se prezintă sub formă de coci ovoizi sau sferici, cu un diametru de 0,8 — 1μ, dispuși în diplo și lanțuri de lungimi variabile. Lungimea lanțurilor depinde de specie, de tulpină și de mediile de cultură. La speciile de *Str. viridans* și enterococi predomină formele în diplo și lanțuri scurte. Streptococii piogeni prezintă de obicei lanțuri lungi. Diviziunea cocilor se face într-un singur plan, perpendicular pe axul lanțului. Sînt Gram-pozitivi. În condiții nefavorabile, sub acțiunea antibioticelor, forma, mărimea și afinitatea tinctorială prezintă mari variații. S-au descris forme bacilare, globuloase, Gram-negative, care revin la aspectul normal după cîteva subtreceri pe același mediu (Mihalcu). S-au descris de asemenea tulpini de streptococi piogeni care în primele ore de creștere pot prezenta o capsulă din acid hialuronic, ce dispare o dată cu eliberarea hialuronidazei.

Unele specii de enterococi și de *Str. viridans* posedă capsule de natură polizaharidică.

Se cunosc de asemenea variante mobile, ciliate, de enterococi.

Caractere biochimice și de metabolism. Creșterea și multiplicarea sînt condiționate de prezența în mediile de cultură a unor factori care nu pot fi sintetizați de streptococi. Vitaminele hidrosolubile (folina, acidul pantotenic, acidul nicotinic, tiamina, riboflavina, piridoxalul și acidul folic) sînt necesare dezvoltării streptococilor grupa A, speciile de *Str. viridans* fiind mai puțin pretențioase. Streptococii din grupul A au nevoie și de glutamină, tirozină, acid tioglicolic și streptogenină (factor de natură polipeptidică extras din ficat). Lichidele organice (sîngele, serul sanguin, ascita) asigură aportul diferiților factori menționați. Glucoza reprezintă o sursă importantă de energie, care inițiază creșterea.

Temperaturile de dezvoltare pentru diferitele specii de streptococi variază între 10 și 50° și constituie un criteriu important de diferențiere.

Temperatura de dezvoltare a streptococilor piogeni este în jurul a 37°, iar pH optim 7,4 — 7,6.

Streptococii sînt aerobi, anaerobi și microaerofili.

Caractere de cultură. Aspectul culturilor în bulion variază în raport cu tulpina. Variantele „R" prezintă un depozit format din grunji mari, disociabili la agitare, cu lichidul supernatant clar. Variantele virulente produc turbiditate aproape uniformă, cu depozit foarte redus, asemănătoare formelor de colonii „S".

Pe mediile solide gelozate, coloniile sînt mici, opace, pulverulente, iar în geloză profundă sînt lenticulare.

La examinarea cu lupa (18 ×) se deosebesc cel puțin 4 feluri de colonii, al căror aspect depinde de structura antigenică a germenilor:

a) Colonii „mucoide" rotunde, convexe, lucioase, de consistență mucoasă, cu tendință la confluență, caracteristice culturilor încapsulate.

b) Colonii mate („matt"), turtite, neregulate, cu suprafața mamelonată, de consistență apoasă. Tendința la confluență a acestor colonii

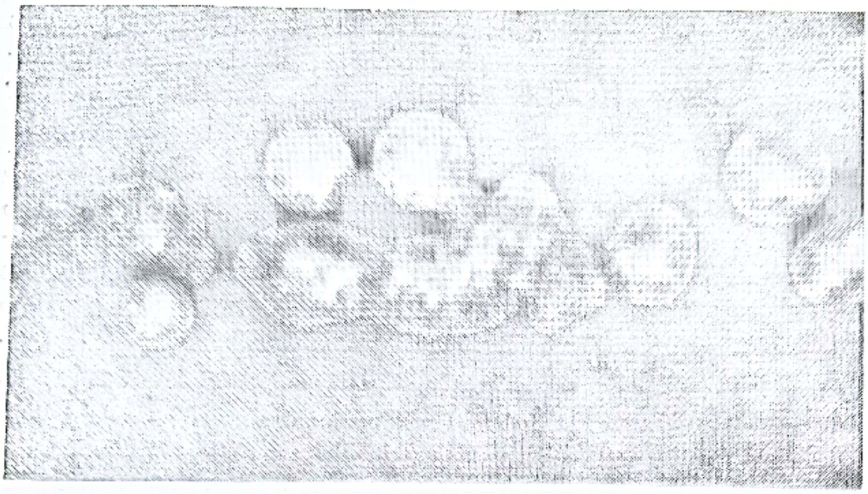


Fig. 89. — Colonii „matt” de streptococ.

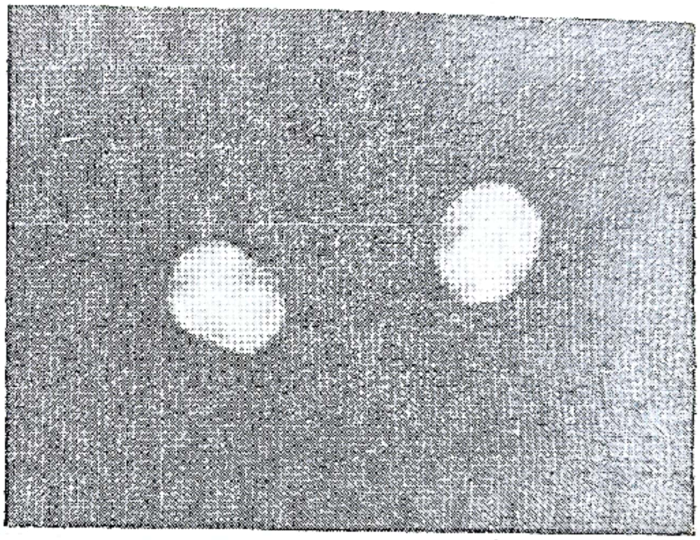


Fig. 90. — Colonii „glossy” de streptococ.

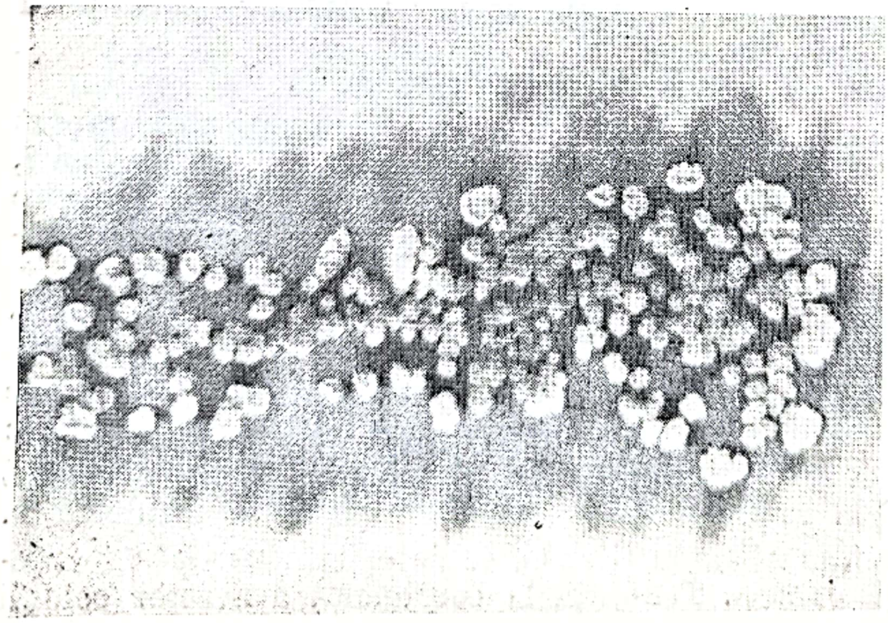


Fig. 91. — Colonii „rugoase” de streptococ.

imprimă culturii un aspect de desen geografic, cu margini neregulate, vizibile şi cu ochiul liber.

c) Colonii lucioase („glossy”), rotunde, bine delimitate, opace, cu centrul ridicat, conic.

d) Colonii „rugoase”, turtite, zbîrcite, cu margini dinţate, uneori întoarse în sus ca frunzele uscate.

În culturile vechi de laborator, se pot întîlni diferite forme de trecere S — R.

e) Unele specii (grupurile F şi G) dau colonii pitice.

Coloniile mucoase şi matt sînt caracteristice tulpinilor virulente, bogate în substanţă M, în timp ce coloniile „glossy” şi rugoase corespund variantelor atenuate, lipsite de substanţă M.

După unele date (Wilson, 1959), variaţia „mucoid” — „matt” „glossy” este determinată, în primul rînd, de prezenţa sau absenţa capsulei. Substanţa M nu exercită un efect direct asupra configuraţiei coloniei. Coloniile mucoide şi „matt” sînt constituite din germeni încapsulaţi, posedînd cel mai adesea şi substanţă M, în timp ce coloniile „glossy” aparţin germenilor lipsiţi de capsulă şi în general şi de substanţă M. Pentru aceste motive, se propune ca fazele de dezvoltare a streptococilor să fie denumite mucoidă, postmucoidă („matt”), nemucoidă („glossy”), rămînînd ca prezenţa sau absenţa substanţei M la culturile din diferite faze să fie desemnată prin M^+ şi M^-.

Formele „Z” au fost descrise atît la streptococii α, cît şi la cei β-hemolitici.

Capacitatea hemolitică, observată încă din 1893, a permis lui Schottmüller (1903) să distingă pe mediile solide cu sînge speciile de streptococi hemolitici şi de *Str. viridans*. Comportarea pe mediile cu sînge constituie o metodă de diferenţiere a speciilor hemolitice de streptococi care sînt cel mai adesea şi patogene, de specii nehemolitice în general slab patogene.

Streptococii se împart, din punct de vedere al comportării pe mediile cu sînge, în 4 categorii :

a) Streptococii hemolitici de tip beta (β) produc o zonă clară de hemoliză, cu un diametru de 1 — 2 mm în jurul coloniei.

b) Streptococii hemolitici de tip alfa prim (α') care produc o hemoliză incompletă, mai puţin clară şi în care se observă grupuri de hematii nehemolizate.

c) Streptococi hemolitici de tip alfa (α) sau *Str. viridans*, sînt caracterizaţi printr-o zonă verzuie în jurul coloniei.

d) Streptococi nehemolitici de tip gama (γ) care nu produc nici o modificare a mediului cu sînge.

Acţiunea hemolitică de tip β se datoreşte toxinelor hemolitice — streptolizinele „O” şi „S” — elaborate de germeni. Hemoliza *viridans* de tip α rezultă din acţiunea a doi factori, dintre care unul produce liza globulelor, iar celălalt transformă hemoglobina într-un derivat feric.

Streptococii sînt hemofermentativi, avînd capacitatea să scindeze hidrocarbonatele pînă la acid lactic, practic fără alte produse finale. Capacitatea de fermentare a anumitor zaharuri constituie o probă de diferenţiere a speciilor, mai ales în grupurile *viridans* şi enterococ. Astfel, trehaloza şi sorbitolul diferenţiază piogenii umani de cei animali ;

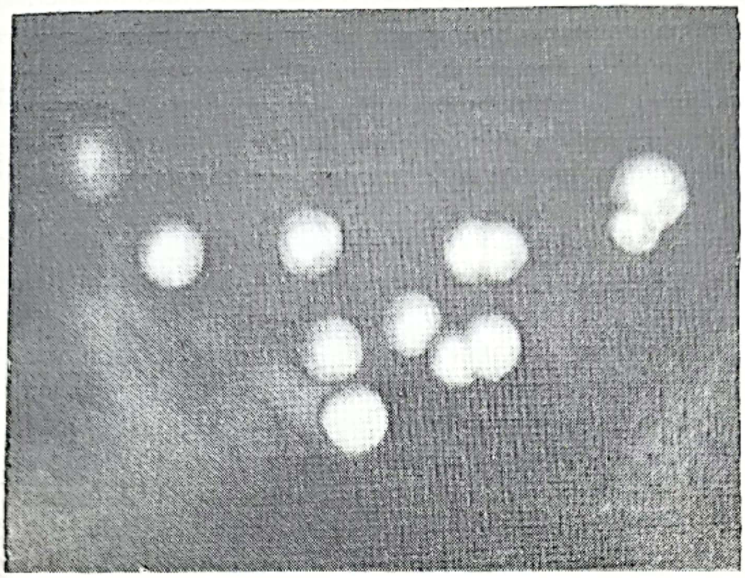


Fig. 92. — Colonii „S-R" de streptococ.

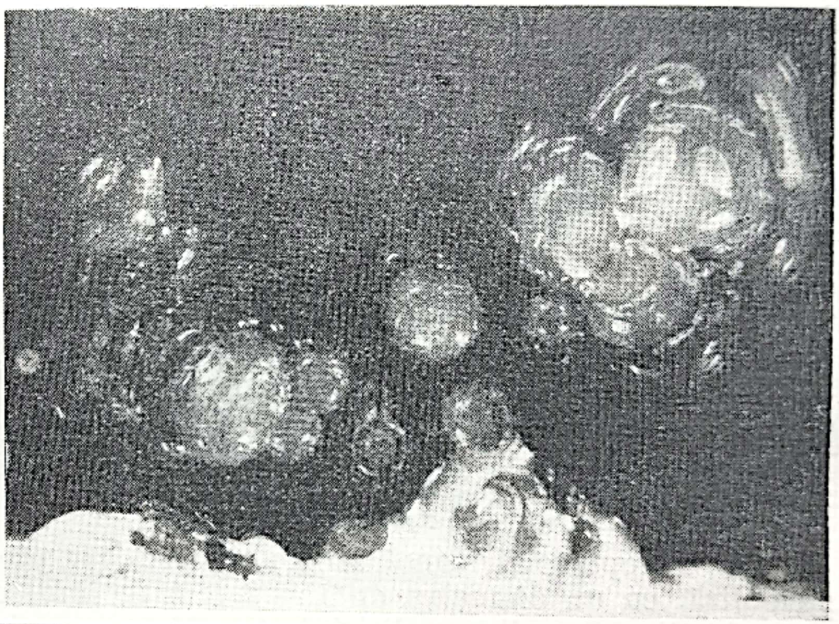


Fig. 93. — Streptococ *viridans* — tulpină producătoare de levan.

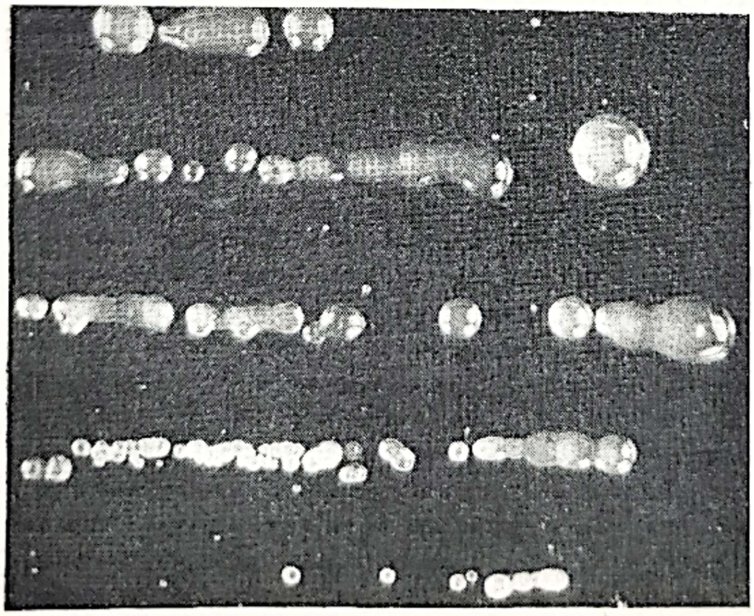


Fig. 94. — Streptococ *viridans* — tulpină producătoare de levan.

esculina este fermentată numai de enterococi; rafinoza şi arabinoza sînt utile pentru a deosebi speciile din grupurile *Str. viridans* — enterococ etc.

Reducerea albastrului de metilen în lapte şi coagularea acestuia, comportarea faţă de laptele turnesolat, dezvoltarea pe medii cu 10 şi 40% bilă, pe medii clorurate 4 şi 6,5%, pe medii cu pH 9,6, hidroliza hipuratului de sodiu şi a argininei, formarea de amoniac din peptonă reprezintă teste de diferenţiere a speciilor de streptococi (tabelul XV).

Rezistenţa la agenţi fizici, chimici şi biologici. Majoritatea speciilor de streptococi sînt distruse la 55°; toate speciile sînt practic omorîte la 60°, timp de o oră, iar pasteurizarea laptelui la 62° asigură distrugerea speciilor termofile de streptococ.

Streptococii pot supravieţui timp de cîteva săptămîni în secreţiile faringiene uscate sau pe tampoane de vată înmuiate în culturi, la întuneric şi la temperatura camerei. Culturile liofilizate se conservă timp de ani de zile, cu păstrarea tuturor caracterelor.

Faţă de antiseptice şi dezinfectante streptococii prezintă o sensibilitate egală cu a altor germeni nesporulaţi, fiind distruşi de: fenol 2 — 5%; sublimat 1/200 — 1/2 000; apă oxigenată; tinctură de iod; mercurocrom 2%. Sînt mai puţin sensibili decît stafilococii şi speciile Gram-negative la coloranţii de trifenilmetan, ceea ce a determinat utilizarea violetului genţiană în mediile selective pentru izolarea streptococilor.

Streptococii piogeni se numără printre germenii cei mai sensibili la acţiunea penicilinei. Nu s-au semnalat, pînă în prezent, tulpini de streptococi piogeni rezistente la penicilină, cu toată utilizarea largă a acestui antibiotic. Streptococii grupului A sînt cu deosebire sensibili la bacitracină, ceea ce permite diferenţierea lor de celelalte specii hemolitice mai rezistente. Speciile de *Str. viridans* şi enterococii, mai puţin sensibile la penicilină, sînt însă sensibile la asociaţia penicilină-streptomicină. Sulfamidele exercită asupra streptococilor o acţiune bacteriostatică. Dobîndirea rezistenţei la sulfadiazină, a unor tulpini de streptococi intens patogene, a fost observată în colectivităţi, în care s-a făcut administrare de masă a acestei sulfamide. Este notată de asemenea dobîndirea rezistenţei la tetracicline cu păstrarea sensibilităţii la penicilină.

Bacteriofagii streptococici, cunoscuţi pînă în prezent, manifestă o specificitate accentuată pentru anumite grupuri serologice (A, C, D). Cercetările făcute de Ciucă, Baldovin, Mihalcu şi Beloiu (1959) lasă să se întrevadă posibilitatea utilizării fagilor ca mijloc de diferenţiere a speciilor de enterococi.

Structura antigenică. Stabilirea structurii antigenice a streptococilor se datoreşte cercetărilor întreprinse de Lancefield din 1927 pînă în prezent. Folosind extracţia cu acid clorhidric la cald, autoarea a pus în evidenţă la streptococii hemolitici existenţa a diferite fracţiuni de natură proteică, nucleoproteică şi glucidică, posedînd o specificitate de gen, de grup sau de tip.

— Substanţe cu specificitate de gen. Substanţa de bază a celulei microbiene este constituită de o nucleoproteină nespecifică, substanţa P, comună tuturor streptococilor hemolitici şi nehemolitici şi înrudită cu substanţe similare ale altor coci Gram-pozitivi (pneumococi, stafilococi). Substanţa P nu pare a avea rol în virulenţa germenului.

— Substanțe cu specificitate de grup. Substanța C este un poliozid, compus din ramnoză, glucozamină și cantități mici de acid muramic. Intră în compoziția peretelui celular, contribuind la rigiditatea structurală a acestuia. Streptococii cultivați în medii cu antibiotice pierd substanța C (Mihalcu). Nu are rol direct în patogenitate sau imunitate, deși recent Schwab și Cromartie (1960) au sugerat că ar putea să joace un rol în anumite boli de țesut conjunctiv, consecutive infecțiilor streptococice.

Poliozidul singur nu este antigenic. Serurile specifice de grup se obțin prin imunizarea iepurilor cu culturi totale, tripsinizate.

Posedă specificitate de grup. Pe baza ei, streptococii se împart în 17 grupuri, notate de la A pînă la S.

— Substanțe cu specificitate de tip. În cadrul diferitelor grupuri Lancefield există tipuri serologice. Substanțele cu specificitate de tip la streptococii piogeni umani (grup A) și animali (grup C) sînt de natură proteică, pe cînd la celelalte grupuri serologice sînt de natură glucidică (substanțe S).

Antigenele cu specificitate de tip la streptococii grupului A sînt substanțele: M, T, R și B.

Substanța sau antigenul M este o proteină acido-solubilă, situată la suprafața externă a peretelui celular. Este inactivată prin tratare cu tripsină sau alte proteinaze, printre care și cea eliberată de tulpini de streptococi.

Determină specificitatea de tip și virulența germenului. Are rol important în imunitate. Se extrage cu acid clorhidric sau cu ajutorul enzimei scoase din lizatul bacteriofagic al streptococilor de grup C. Este slab antigenică.

Substanța sau antigenul T, ca și proteina M, este situată la suprafața streptococilor (Williams, 1960). Distrugerea ei este însoțită și de distrugerea bacteriei. Nu este inactivată de tripsină. Se extrage prin digestie triptică prelungită. Nu are legătură cu virulența sau imunitatea. Este însă cel mai puternic antigen al streptococilor.

Pe baza antigenelor M și T se cunosc în prezent 50 de tipuri. Există trei posibilități de grupare a celor două antigene:

a) tipurile: 1, 2, 6, 9, 11, 14, 18 și 22 au antigenele M și T de același tip;

b) antigenul M al tipului 12 se poate lega fie cu T_{12}, fie cu T_{10}, pentru care motiv aceste două tipuri serologice au fost contopite într-unul singur, tipul M_{12};

c) tipuri cu antigen T complex și M diferit. Există 4 astfel de grupări:

4/24/26/28/29/46/48
5/27/44
15/17/19/23/30
8/25

Astfel, antigenul T_4 poate fi legat de antigenul M_4 sau de M_{24}, M_{26}, M_{28}, M_{29}, M_{46}, M_{48}.

Alte antigene proteice specifice de tip sînt antigenele R și B.

Antigenul R a fost pus în evidență la tipul 28 și apoi la tipul 3, prin extracție acidă. Rezistă la tripsină, nu însă și la pepsină. Nu pare legat de virulență și nu dă protecție la șoarece.

Antigenul B este de natură proteică. Se liberează prin tratare acidă, de la numeroşi streptococi proaspăt izolaţi, mai ales de la cei aparţinînd tipurilor cu care se obţin greu anticorpi. Are rol în inhibarea producerii de anticorpi. Dispare după mai multe pasagii la şoarece.

Substanţa capsulară — acidul hialuronic — nu este antigenică.

Barber, Baldovin, Beloiu şi Pleciaş au identificat, printre antigenele de grup ale enterococilor, o ribo- şi o dezoxiribonuclează. În acelaşi extras au pus în evidenţă şi antigene de tip — polizaharizi — în compoziţia cărora intră şi acizii teicoici.

Clasificare. Clasificarea serologică a streptococilor în grupuri şi tipuri serologice reprezintă un progres deosebit. Apartenenţa serologică de grup corespunde foarte adesea cu patogenitatea pentru anumite specii animale, indicînd şi habitatul natural al acestor streptococi.

Este de reţinut că streptococii patogeni pentru om (*Str. pyogenes*), izolaţi din diferite manifestări morbide, aparţin grupului A. În acelaşi timp, omul găzduieşte fie ca saprofiţi, fie în mod accidental în amigdale, gît, intestin, căile genitale şi pe piele, streptococi din grupurile B, C, D, F, G, H, K, O. Dintre aceste numeroase specii, unele au reprezentanţi animali (grupurile C şi D) pe cînd grupurile F, H, K şi O par a fi specifice omului.

Majoritatea grupurilor Lancefield sînt constituite de specii hemolitice, cu excepţia grupurilor H, K, M şi a unor specii de enterococi (grup D) care nu elaborează hemolizine.

Clasificarea serologică nu cuprinde toate speciile aerobe cunoscute de streptococi.

Clasificarea cea mai cuprinzătoare a streptococilor, bazată pe criteriile serologice şi un minimum de proprietăţi biologice, este cea propusă de Sherman în 1937.

Majoritatea speciilor cunoscute de streptococi se împart în patru grupări:

a) gruparea *Str. pyogenes*, care cuprinde speciile patogene pentru om şi animal;

b) gruparea *Str. viridans* întruneşte în general specii saprofite care pot produce la om infecţii grave de tipul endocardită lentă malignă;

c) gruparea enterococilor, în general saprofiţi este implicată în diferite infecţii la om;

d) gruparea streptococilor lactici cuprinde specii prezente în lapte, nepatogene.

Streptococii din grupul *Str. viridans* nu posedă substanţe hidrocarbonate cu specificitate de grup. Pe de altă parte, tulpini cu antigene de grup (E, K, L, M, O) n-au primit încă o denumire de specie.

Caractere de patogenitate. Caracterele de patogenitate a streptococilor piogeni umani sînt legate de virulenţă şi de toxinogeneză. Principalul factor de *virulenţă* al streptococilor piogeni este substanţa M, care conferă germenilor rezistenţă la fagocitoză şi capacitatea de multiplicare în serul sanguin. Capsula propriu-zisă pare a avea un rol mai puţin important la streptococii piogeni umani, constituind în schimb, principalul factor de virulenţă la streptococii piogeni animali (grup C).

Dintre animalele de laborator, iepurii şi şoarecii sînt cei mai sensibili la infecţia cu streptococi grup A care, prin adaptare, pot deveni

Tabelul XII

Habitatul și patogenitatea obișnuită a streptococilor aparținînd grupelor serologice Lancefield
(după Dubos cu completări)

Grupul serologic	Habitatul obișnuit	Patogenitatea obișnuită	Numărul serotipurilor	Componenta specifică de tip
A	Om	Numeroase boli la om	50	Proteina M
B	Bovidee	Mastită	6 și 15 subtipuri	Polizaharid
C	Diferite specii animale Om (tulpini umane)	Numeroase infecții la animale Infecții respiratorii ușoare	Cîteva 8	Probabil proteină
D	Produse lactate Conținutul intestinal al omului și animalelor	Infecții genito-urinare, tub digestiv și glande anexe, endocardită, infecții ale plăgilor etc.	Numeroase tipuri	Probabil polizaharid
E	Lapte normal Porcine	Necunoscută Abcese faringiene la porci		
F	Om	Îndoielnică (căi respiratorii)	4	Probabil polizaharid
G	Om Cîine	Infecții respiratorii ușoare Infecții căi genitale la cîine	1 mai multe	Probabil polizaharid
H	Om	Îndoielnică : infecții dentare, căi respiratorii, endocardită		
K	Om	Îndoielnică : infecții respiratorii		
L	Cîine	Infecții căi genitale		
M	Cîine	Infecții căi respiratorii		
N	Lapte și produse lactate	Nepatogeni		
O	Om	Îndoielnică : căi respiratorii ; endocardită		
P	Diferite animale : cîine, porc	Bronhopneumonie la porci		
Q	Om	Intestin. Necunoscută		

excesiv de virulenți pentru aceste specii de animale. Trecerea prin organismul șoarecilor sau iepurilor servește la exacerbarea virulenței tulpinilor, care și-au pierdut substanța M. Recăpătarea virulenței se însoțește de variația „glossy"—„matt'—„mucoid", cu creșterea cantității de substanță M și dobîndirea capsulei.

Speciile nehemolitice de streptococi, chiar patogene pentru om, prezintă o virulență slabă sau nulă pentru animalele de laborator.

Tabelul XIII

Caracterele diferenţiale ale streptococilor (după Sherman cu completări)

Grupări	Specia sau grupul serologic	Grup Lancefield	Hemoliză	Creşte la		Dezvoltare în prezenţa de:			Reducere puternică	Supravieţuire 30 minute la 60°	NH_4 din peptonă	Producere de levan	Producere de dextran
				10°	45°	NaCl 6,5%	pH 9,6	Albastru metilen 0,1%					
Gruparea streptococilor piogeni	*Str. pyogenes*	A	+	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−
	Str. mastitidis	B	±	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−
	Str. equi	C	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	Str. pyogenes animalis	C	+	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−
	Grup C uman	C	+	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−
	Grup F (colonie mică)	F	+	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−
	Grup G	G	+	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−
	Grup E	E	+	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−
	Grup H	H	±	−	+	−	−	−	−	±	±	−	+
Gruparea streptococilor *viridans*	*Str. salivarius*		−	−	±	−	−	−	−	−	−	+	−
	Str. mitis		−	−	±	−	−	−	−	−	±	−	−
	Str. sanguis		−	−	±	−	−	−	−	−	+	−	+
	Str. MG		−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−
	Str. equinus		−	−	+	−	−	−	−	−*	−	−	−
	Str. thermophilus		−	−	+	−	−	−	−	+	−	−	−
	Str. acidominimus		−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	Str. uberis		−	+	−	−	−	−	−	±	+	−	−
Gruparea streptococilor lactici	*Str. lactis*	N	−	+	−	−	−	+	+	+*	+	−	−
	Str. cremoris	N	−	+	−	−	−	+*	+*	±	−	−	−
Gruparea enterococilor	*Str. faecalis*	D	−	+	+	+	+	+	+*	+	+	−	−
	Str. faecalis var. *liquefaciens*	D	−	+	+	+	+	+	+*	+	+	−	−
	Str. faecalis var. *zymogenes*	D	+	+	+*	+	+	+	+*	+	+	−	−
	Str. faecium	D	−	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−
	Str. durans	D	+*	+	+*	+	+	+	−	+	+	−	−
	Str. bovis	D	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	+

* Variaţii posibile de la reacţia indicată

Capacitatea de pătrundere, multiplicare şi invadare a organismului este determinată şi de factorii cu caractere de exotoxine secretaţi de streptococi în mediile de cultură şi *in vivo*.

Toxinele streptococice. Streptococii elaborează în mediile de cultură o serie de factori cu acţiune toxică, letală, leucocidinică sau capabili să lezeze celulele unor organe importante, cum sînt inima, rinichiul etc. În afara toxinei eritrogene, cele 10 componente de natură toxică cunoscute, majoritatea acţionînd ca enzime, se pot împărţi în trei categorii, după modul lor de acţiune : a) substanţe care atacă constituenţii sîngelui : streptolizinile „O" şi „S", fibrinolizina sau streptokinaza, leucocidina ; b) substanţe care măresc permeabilitatea ţesuturilor : hialuronidaza ; c) enzime proteolitice şi nucleoproteolitice :

proteinaza, ribonucleaza, dezoxiribonucleazele A, B şi C şi difosfopiridinnucleotidaza. La acestea se adaugă toxina eritrogenă care este toxina scarlatinoasă propriu-zisă.

Toxina eritrogenă (eritroxina, toxina scarlatinoasă, toxina Dick). Întrevăzută de Berge (1893) şi descoperită de Savcenko (1905) a fost identificată de soţii Dick (1923—1924). În ultimii ani au fost obţinute preparate cu un înalt grad de puritate conţinînd 200 000 000 STD[1]/mg proteină. Este o proteină, în componenţa căreia Soru, Sternberg şi Istrati (1957) au identificat numeroşi aminoacizi, printre care alanina.

Inoculată pe cale intradermică la indivizi sensibili (copii) provoacă simptomele toxice ale scarlatinei : greaţă, vărsături, tulburări nervoase şi erupţia caracteristică. Mecanismul de acţiune este puţin cunoscut. Prezintă electivitate pentru pereţii capilarelor şi acţiune letală la animal. Inoculată pe cale intradermică în cantităţi adecvate, produce la indivizii sensibili o reacţie manifestată prin eritem, reacţia Dick, care permite decelarea indivizilor receptivi la scarlatină. Toxina Dick este antigenică, indivizii care au făcut scarlatină dobîndind o imunitate durabilă. Prin imunizarea cailor se obţine o antitoxină capabilă să neutralizeze efectele toxinei. Toxina ca atare sau anatoxina streptococică posedă capacitatea imunizantă pentru om, fiind utilizate în vaccinările preventive antiscarlatinoase.

Toxina scarlatinoasă nu este unică. Se cunosc cel puţin 3 componente eritrogene antigenic deosebite, deşi majoritatea tulpinilor de streptococi secretă o toxină neutralizată de serul preparat numai cu tulpina de streptococ denumită Dochez NY_5.

Hemolizinele (streptolizinele). Acţiunea hemolitică a streptococilor este printre primele manifestări toxice cunoscute la aceşti germeni. Todd a stabilit că în filtratele culturilor de streptococi există două componente care manifestă proprietăţi hemolitice : streptolizina „O", sensibilă la acţiunea oxigenului şi streptolizina „S", stabilă la oxigen. Cu toate că ambele lizează hematiile diferitelor specii animale, cele două streptolizine se deosebesc fundamental, fiind distincte şi din punct de vedere antigenic.

Streptolizina „O" este elaborată de streptococii grupurilor A, C uman şi G, pe cînd streptococii din grupurile B, C animal, D, E, H, K produc streptolizină „S". Majoritatea streptococilor grup A secretă ambele feluri de streptolizine.

Streptolizina „O", alături de acţiunea hemolitică, posedă capacitate letală pentru şoareci şi o acţiune cardiotoxică, atît asupra inimii de broască, cît şi a mamiferelor. Streptolizina „O" este prin excelenţă antigenică, anticorpul respectiv punîndu-se în evidenţă atît în serul animalelor inoculate cu streptolizină „O" sau cu culturi vii de streptococi, cît şi în serul bolnavilor cu afecţiuni streptococice.

Streptolizina „S" este rezistentă la acţiunea oxigenului şi nu este antigenică. Preparate conţinînd pînă la 30 000 u./mg au fost obţinute, în condiţii speciale, de către Bernheimer din streptococi în stare de repaus. Streptolizina „S" acţionează ca o dezoxiribonuclează şi exercită o acţiune toxică marcată la şoareci.

---

[1] Activitatea toxinei Dick se exprimă în doze reacţionale cutanate (STD=skin test dosis).

Fibrinolizina sau streptokinaza. Tillet şi Garner (1933) au arătat că streptococii hemolitici patogeni pentru om lizează cheagul de fibrină umană. Cercetările care au urmat au arătat că mecanismul de fibrinoliză este complex. Principiul activ din filtratele de streptococi este o kinază care activează factorul litic existent în serul sanguin normal. Factorul fibrinolitic a fost denumit plasmină ; precursorul inactiv din ser s-a numit plasminogen, iar activatorul plasminogenului din culturile de streptococi a primit denumirea de streptokinază.

Streptokinaza are utilizare în terapeutică ca agent litic al cheagurilor formate după intervenţii chirurgicale (mai ales toracice), în care scop se administrează în combinaţie cu preparate de dezoxiribonuclează (streptodornază).

Nucleazele (ribonucleaza şi dezoxiribonucleaza). Streptococii grupului A secretă cantităţi însemnate din aceste enzime. Dezoxiribonucleaza, denumită prescurtat streptodornază, scindează cu rapiditate proteinele dezoxiribozice din exsudatele patologice, fiind utilizată în scop terapeutic împreună cu streptokinaza.

După Wannamacker, streptococii grupului A secretă 3 dezoxiribonucleaze A, B şi C, imunologic distincte, cu variaţii mari de la tulpină la tulpină. Toate 3 sînt antigenice, anticorpii homologi corespunzători fiind puşi în evidenţă în serurile persoanelor cu infecţii streptococice.

Proteinaza. Elliot a observat că unele culturi de streptococi grup A nu produc substanţă M cînd sînt incubate la 37°, dar conţin această substanţă cînd culturile sînt lăsate la temperatura camerei (22°). Dispariţia substanţei M la temperatura de 37° se datoreşte unei enzime proteolitice, proteinaza, capabilă să digereze fibrina, cazeina şi substanţa M a streptococilor. Ea are drept origine un precursor inactiv. Atît precursorul, cît şi enzima au fost obţinute sub formă cristalizată. Proteinaza exercită o acţiune cardiotoxică.

Hialuronidaza. Streptococii secretă o enzimă, hialuronidaza, capabilă să depolimerizeze acidul hialuronic. Ea acţionează ca factor de invazie şi distruge capsula streptococilor, compusă din acid hialuronic. Din această cauză, capsulele nu sînt vizibile decît în culturile foarte tinere, cînd hialuronidaza nu a fost încă elaborată. Producerea de hialuronidază *in vitro* apare repartizată inegal la diferitele tipuri serologice de streptococi. Tipurile serologice 4 şi 22 sînt printre cele mai active. Prezenţa antihialuronidazei în serul bolnavilor suferind de infecţii streptococice, provocate de diferite tipuri de streptococi, care apar inactive *in vitro*, face să se presupună că enzima se pune în libertate mai ales *in vivo*.

Difosfopiridinnucleotidaza scindează coenzima difosfopiridinnucleotidul care are rol în mecanismul oxidativ al celulelor. Tipurile serologice 4, 25 şi 12 sînt printre cele mai active producătoare de difosfopiridinnucleotidază. Acţiunea citotoxică se manifestă asupra miocardului, leucocitelor etc. Este considerată drept factorul nefrotoxic al streptococilor.

Acţiunea leucocidinică manifestă a streptococilor piogeni, atribuită altădată streptolizinei „O", pare să fie datorită, mai degrabă, difosfopiridinnucleotidazei.

Există o extraordinară variabilitate în ceea ce priveşte secretarea diferitelor componente de natură antigenică sau enzimatică de către streptococi. Variaţiile nu se mărginesc la diferitele serotipuri, ci se manifestă chiar la diferitele tulpini aparţinînd aceluiaşi tip serologic. Aceste constatări sînt în măsură să explice potenţialităţile patogene multiple, cît şi gama imensă de manifestări clinice, pe care le pot provoca streptococii.

Infecţiile streptococice ale omului. Aspectele clinice ale infecţiilor provocate de streptococi sînt condiţionate, pe de o parte, de receptivitatea şi reactivitatea diferită a organismului la infecţia streptococică (vîrstă, atingeri anterioare), cu posibilitatea mai multor porţi de intrare şi cu localizări organice multiple, iar pe de altă parte, de capacitatea tulpinilor infectante de a elabora diferiţi factori de patogenitate.

La copii mici, infecţia streptococică evoluează fără tendinţă de localizare, simptomul principal fiind febra prelungită. Între 3 şi 12 ani, tendinţa la localizare se manifestă prin afecţiuni de tipul angină-scarlatină, cu simptomatologie generală accentuată, iar la adolescenţi, sechelele infecţiilor streptococice (glomerulonefrita acută şi reumatismul) sînt frecvent semnalate. Adulţii fac rar infecţii streptococice de tip acut.

În evoluţia infecţiilor streptococice acute se disting trei perioade: 1) infecţia primară (angină, scarlatină) cu complicaţiile precoce (otită, limfadenită, nefrită); 2) perioada complicaţiilor tardive, în jurul celei de a treia săptămîni de la debut, de obicei cu alt tip de streptococ decît cel infectant şi 3) sechelele reprezentate de nefrita acută şi reumatism, care apar după o perioadă de latenţă de 2—6 săptămîni.

Infecţiile streptococice ale pielii prezintă o mare diversitate de forme clinice: erizipelul, impetigo contagiosa, ectima, pemfigusul nounăscuţilor etc. Erizipelul este o inflamaţie streptococică a dermului cu multiplicarea germenilor în spaţiile limfatice. Poarta de intrare este constituită de soluţii de continuitate a pielii. Infectarea se face adesea cu streptococii purtaţi de bolnavi în rinofaringe (erizipelul feţei). Clinic se prezintă ca o placă întinsă roşie, cu marginile ridicate, pe suprafaţa căreia apar vezicule pline cu lichid (erizipelul bulos), din care se pot izola streptococi.

Infecţiile cu streptococi ale plăgilor cutanate (arsuri, plăgi chirurgicale) pot duce la celulite, flegmoane, limfangită, limfadenită.

Căile respiratorii superioare pot fi sediul a numeroase infecţii cu streptococi: nazofaringite, amigdalite, scarlatină, sinuzită, otită. Laringita, traheobronşita, bronhopneumonia, pleurezia fac parte dintre manifestările streptococice ale tractului respirator inferior.

Angina streptococică (roşie, cel mai frecvent; pultacee sau pseudomembranoasă, rareori) evoluează mai ales în timpul epidemiilor de scarlatină, şi paralel cu ele, şi se distinge de această boală prin faptul că indivizii afectaţi, posedînd o imunitate antitoxică, nu prezintă erupţie.

Scarlatina este o boală acută contagioasă, caracterizată prin angină, febră, rash caracteristic şi fenomene toxice de diferite grade, mergînd pînă la formele hipertoxice. Complicaţiile cu limfadenita, otita, nefrita se pot termina cu septicemie.

Febra puerperală este provocată de pătrunderea streptococului în tractul genital al parturientelor, infecţia datorîndu-se, în marea majoritate a cazurilor, streptococilor piogeni grup A. Infectarea se face fie cu streptococii purtaţi de bolnavi în rinofaringe, fie de la personalul purtător sau prin instrumentele infectate. Parturientele cu reacţia Dick pozitivă fac infecţia însoţită de rash (scarlatina puerperală). Peritonita şi septicemia constituiau complicaţiile de temut ale febrei puerperale, înainte de apariţia antibioticelor. Streptococii anaerobi endogeni, din căile genitale, sau streptococii aparţinînd altor grupuri decît grupului A produc infecţii post partum de tipul endometritei.

Infecţiile streptococice ale tubului digestiv de tipul gastrită, enterocolită flegmonoasă, apendicită, colecistită, peritonită sînt provocate de speciile de enterococi şi streptococi nehemolitici, care sînt totodată şi agenţii etiologici ai infecţiilor urinare (pielită, pielonefrită, cistită).

Septicemia streptococică iniţială sau urmînd unei infecţii localizate este rar întîlnită astăzi.

Endocardita acută septică este datorită streptococilor grup A, pe cînd endocardita lentă malignă este cauzată, în proporţii sensibil egale, de enterococi sau de *Streptococcus viridans.* După observaţiile noastre, 30 % dintre *Streptococcus viridans* aparţin *Str. sanguis*, dextran pozitive.

Tipurile de streptococi piogeni, cauzatori ai variatelor infecţii, nu prezintă o specificitate de infecţie, oricare tip de streptococ grup A putînd provoca oricare dintre îmbolnăviri. Tipurile serologice de streptococi piogeni, întîlnite în diferitele infecţii la un moment dat, sînt cele care predomină în momentul respectiv la purtătorii sănătoşi.

Infecţiile streptococice ale animalelor. Numeroasele specii animale sînt infectate spontan de infecţii cu streptococi piogeni aparţinînd altor grupuri serologice decît grupului A. Printre acestea semnalăm: limfadenita cobailor, epizootiile şoarecilor albi, septicemiile fatale la pisici. Gurma cailor, datorită piogenilor animali (grup C), este o infecţie acută, contagioasă, cu poartă de intrare mucoasa bucală şi manifestată prin prinderea ganglionilor submaxilari. Mastita bovideelor recunoaşte ca agenţi etiologici streptococii grup B sau grup C şi mult mai rar streptococi grup A, care, prezenţi în lapte, pot provoca la om epidemii de origine alimentară.

Infecţia experimentală. Puţine dintre manifestările streptococice ale omului au putut fi reproduse la animale. Erizipelul a fost obţinut la iepuri prin inocularea culturilor la baza urechii (Babeş) şi la cobaii sensibilizaţi în prealabil, printr-o injecţie de streptococi omorîţi. Scarlatina experimentală a constituit preocuparea lui Cantacuzino, Bernhardt şi Zlatogorov, care au încercat să reproducă scarlatina la iepuri şi maimuţele inferioare. Dificultatea de a reproduce scarlatina la animale se datoreşte faptului că omul este singura specie sensibilă la toxina eritrogenă. Scarlatina experimentală la om a fost realizată de Dick şi alţi autori prin badijonarea amigdalelor cu culturi de streptococi la persoanele cu reacţia Dick pozitivă. Înghiţirea de culturi de laborator poate fi urmată de angină-scarlatină. Injectarea accidentală de streptococi patogeni (sînge conservat şi alte produse biologice) poate da naştere unei infecţii streptococice scarlatinoase cu aspect toxic grav, letal, dacă nu se instituie precoce tratamentul cu antitoxină scarlatinoasă şi penicilină. Angina streptococică tipică a fost reprodusă la maimuţele superioare prin badijonarea amigdalelor cu culturi de streptococi. Infectarea pe cale nazală la aceleaşi animale, urmată de o infecţie clinică, subclinică sau stare de purtător, a permis obţinerea de informaţii în ceea ce priveşte imunitatea cu specificitate de tip.

Animalele mici de laborator fac infecţii de tip septic, care duc rapid la generalizare, în raport cu calea de inoculare şi virulenţa tulpinii de streptococ.

Imunitate. Imunitatea antistreptococică este complexă, de natură antitoxică şi antimicrobiană.

Imunitatea faţă de toxina scarlatinoasă (eritrogenă) este durabilă. Peste 95% dintre scarlatinoşii netrataţi cu antibiotice nu făceau boala decît o singură dată. Prin tratamentul cu penicilină, care stinghereşte stabilirea imunităţii, aproximativ 13% din scarlatinoşi pot face îmbolnăviri repetate. Imunitatea antitoxică poate fi obţinută prin injectarea de toxină sau anatoxină scarlatinoasă. Ea poate fi dobîndită şi prin repetate afecţiuni subclinice cu streptococi toxigeni, după cum dovedeşte rezistenţa la scarlatină a adulţilor care nu au făcut boala în copilărie. Imunitatea antitoxică nu protejează faţă de celelalte tipuri de infecţii streptococice (angină, erizipel).

Imunitatea de natură antibacteriană se datoreşte prezenţei anticorpilor anti-M, fiind deci o imunitate specifică de tip, după cum dovedesc observaţiile la om şi experimental pe animale. În serul convalescenţilor de infecţii streptococice sau al animalelor infectate cu un anumit tip de streptococ M^+ apar anticorpi (aglutinine, precipitine, anticorpi bacterostatici şi protectori) faţă de tipul corespunzător de streptococ. La om, anticorpii faţă de tipul infectant de streptococ pot persista 3—5 pînă la 32 de ani după infecţie (Lancefield, 1959). În serurile adulţilor sănătoşi se găsesc anticorpi pentru diferitele tipuri de streptococi cu care aceştia au venit în contact în decursul anilor, prin infecţii clinice, subclinice sau ca purtători sănătoşi.

Multiplicitatea tipurilor de streptococi şi imunitatea cu specificitate de tip explică de ce un individ poate face în decursul vieţii infecţii repetate cu aceşti germeni. Este foarte probabil că şi componentele toxice ale streptococilor joacă un rol în stabilirea rezistenţei la infecţii.

Studiul anticorpilor antistreptolizină ,,O'', antihialuronidază, antistreptokinază, antiproteinază a arătat prezenţa lor în toate afecţiunile streptococice. Dintre aceştia, reacţia de determinare a antistreptolizinelor ,,O'' constituie un test valoros de diagnostic, important mai ales în formele uşoare sau inaparente de boală.

Dinamica acestor anticorpi furnizează date preţioase asupra evoluţiei bolii şi urmăririi eficacităţii tratamentului.

Tratamentul specific. Seroterapia antitoxică este reprezentată de serurile antitoxice preparate pe cai şi serurile de convalescenţi.

a) Serul antitoxic Dick este obţinut prin imunizarea animalelor cu toxină, iar serul de tip Dochez este un ser mixt antitoxic şi antimicrobian. Serul antiscarlatinos, tip Dochez, preparat în ţara noastră, este un ser obţinut prin imunizarea cailor cu toxină preparată cu tulpina Dochez NY_5 şi cu culturi toxigene de streptococi aparţinînd tipurilor locale întîlnite în scarlatină şi alte infecţii streptococice. Unitatea de ser antitoxic antiscarlatinos neutralizează 50 STD toxină.

b) Serul de convalescenţi de scarlatină reprezintă al doilea mijloc de tratament antitoxic al formelor hipertoxice de boală.

Seroterapia antitoxică își păstrează indicațiile în formele toxice de scarlatină, cu condiția să fie aplicată cît mai precoce, în doze eficiente și concomitent cu cantități mari de penicilină.

Seroterapia antimicrobiană. Serul antistreptococic antimicrobian a dat rezultate mai puțin satisfăcătoare în trecut, el reușind totuși înaintea erei antibioticelor să salveze numeroase cazuri de septicemie streptococică (Gorescu, Popescu și Panaitescu, 1930; Popescu și Panaitescu, 1931).

Imunotransfuziile de la adulții vaccinați cu tulpinile de *Str. viridans* izolate de la bolnavi au fost utilizate în tratamentul endocarditei lente maligne.

Vaccinoterapia. Autovaccinurile sau stock-vaccinurile streptococice sînt indicate în tratamentul streptocociilor cu aspect cronic trenant, în asociație cu anatoxina. Administrarea în doze mici desensibilizante, dau rezultate bune în cazurile care au la bază o componentă alergică (streptodermii).

Sulfamidele au reprezentat un progres în terapia complicațiilor septice ale infecțiilor streptococice. Ele nu sînt indicate în tratamentul infecțiilor acute, deoarece exercită numai o acțiune bacteriostatică.

Antibioticele. Penicilina este antibioticul de elecție pentru tratamentul infecțiilor cu streptococi piogeni. Dozele și forma medicamentoasă depind de forma clinică și gravitatea infecției. Alături de acțiunea terapeutică, penicilina previne apariția complicațiilor tardive, de natură alergică (reumatismul articular acut, glomerulonefrita acută streptococică).

În infecțiile închistate (osteomielită, flegmoane, abcese), tratamentul chirurgical este indispensabil.

În infecțiile provocate de enterococi sau *Str. viridans*, mai rezistenți la acțiunea penicilinei, se utilizează asociația penicilină-streptomicină. Antibioticele cu spectru larg, deși mai active *in vitro*, sînt contraindicate din cauza acțiunii lor bacteriostatice care nu permite eradicarea infecției.

Diagnosticul de laborator

Recunoașterea dintre numeroasele specii de streptococi comensali, care se întîlnesc în cavitățile deschise ale omului, a streptococilor de grup A (streptococul piogen), principalul agent al infecțiilor la om, constituie obiectivul principal al diagnosticului de laborator.

Privind problema multitudinii infecțiilor streptococice și a purtătorilor sănătoși ca o entitate epidemiologică supusă unei profilaxii comune, diagnosticul de laborator trebuie să vizeze:

1) precizarea diagnosticului de boală streptococică;

2) prevenirea complicațiilor tardive, prin tratarea corectă cu penicilină a cazurilor descoperite la timp;

3) depistarea purtătorilor sănătoși de același tip epidemic și luarea de măsuri în vederea limitării focarului epidemic și prevenirii bolii reumatismale.

Diagnosticul de laborator al infecțiilor streptococice cuprinde: diagnosticul bacteriologic; diagnosticul serologic; diagnosticul biologic.

A. Diagnosticul bacteriologic 1. *Recoltarea și însămînțarea produselor.* Produsele patologice sînt tot atît de variate ca și infecțiile provocate de acest germen: exsudat faringian și nazal, spută, lichid cefalorahidian, puroi, exsudat pleural, secreția vaginală și a colului uterin, secreție otică, urină, sînge, material necropsic.

Rezultatele examenului bacteriologic depind în cea mai mare măsură de modul de recoltare a produsului.

a) *Exsudatul nazofaringian* se recoltează cu tampoane sterile montate pe o tijă de sîrmă sau lemn, de pe amigdale, pilieri, peretele posterior al faringelui, fără a atinge baza limbii, palatul sau pomeții. Recoltarea trebuie făcută dimineața, înainte de masă, sau la 3—4 ore după aceasta. Se vor evita gargarismele cu diverse soluții antiseptice. Este de preferat ca prelevarea să se facă înainte de începerea tratamentului cu antibiotice sau sulfamide. În cazul în care tratamentul nu putea fi amînat, trebuie menționat acest lucru, cu indicarea antibioticului sau chimioterapicului.

Însămînțarea tampoanelor trebuie făcută în cel mai scurt timp posibil de la recoltare. Dacă tampoanele s-au uscat, este bine să se umecteze cu cîteva picături de bulion sau ser fiziologic, înainte de însămînțare.

Probele recoltate de pe teren, care nu pot fi însămînțate în timp util (3—4 ore), se introduc în mediul de conservare și de îmbogățire.

b) *Sputa și produsul obținut prin bronhoscopie* se recoltează, fie în plăci Petri sterile, fie în orice alt recipient cu gît larg, steril, fără a se adăuga vreun dezinfectant.

Se aleg pentru însămînțare porțiunile cele mai purulente.

c) *Sîngele.* Se recoltează prin puncție venoasă sau arterială, 18 ml sînge. Din această cantitate, 3 ml se pun într-un tub steril care conține 3 ml soluție sterilă de citrat de sodiu 2%. Restul se repartizează imediat în 3 balonașe a cîte 250 ml bulion glucozat 2‰. Cele 3 balonașe se incubează separat, aerob, anaerob și în atmosferă de 10% CO_2.

Se fac subculturi după 24 și 72 de ore și apoi la interval de 5—7 zile, timp de 3 săptămîni, pe geloză-sînge.

Este preferabil ca hemocultura să fie făcută în perioadă febrilă.

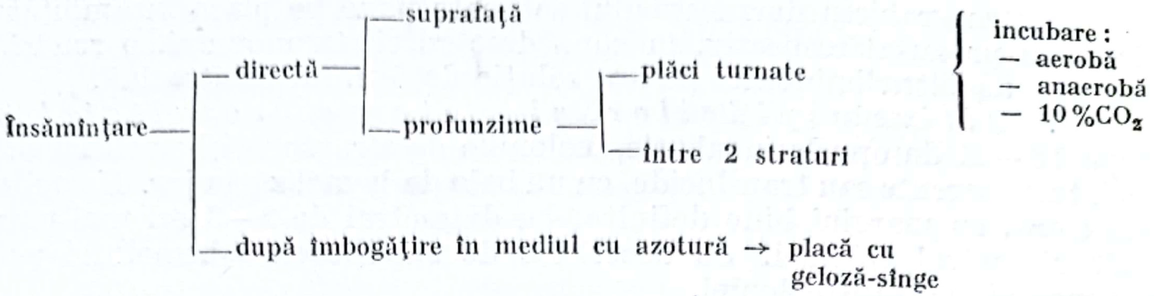
d) *Alte produse patologice lichide sau purulente* (*urină, lichid cefalorahidian, exsudat pleural* etc.) se centrifughează și se însămînțează pe plăci cu geloză-sînge, care se incubează aerob, anaerob și în atmosferă de 10% CO_2.

e) *Secreții vaginale și ale colului uterin.* Recoltarea se face cu tampoane sterile. Incubația anaerobă este foarte importantă; ea poate pune în evidență streptococii microaerofili, responsabili de infecția puerperală endogenă.

f) *Probele de lapte* se păstrează la gheață pînă la însămînțare. Se centrifughează, îndepărtîndu-se pătura intermediară. Sedimentul și smîntîna se amestecă, se însămînțează pe geloză-sînge, de preferat în profunzime și se fac frotiuri.

Frotiul direct din produsele patologice este obligatoriu. Prezența streptococului piogen nu se poate pune în evidență decît prin însămînțare și identificare.

3. *Metode de însămînțare* :



a) *Însămînțarea în suprafață* este metoda cea mai frecvent utilizată. Mediul folosit este geloza-sînge, turnată în plăci Petri. În cazul tamponului faringian, acesta se descarcă pe un sector de placă radiar, răsucind tamponul, pentru ca toate fețele lui să vină în contact cu placa. Cu o baghetă de sticlă sterilă, în L, se diseminează pe restul plăcii astfel : ramura scurtă a baghetei fiind egală cu raza cutiei Petri, se trece această ramură peste suprafața însămînțată și cu unghiul baghetei fixat în centrul plăcii se descrie un arc de 360°.

În lipsa baghetei, diseminarea se poate face cu ansa, descriind pe suprafața plăcii 3—4 fascicule de striuri paralele.

Plăcile se incubează timp de 18—24 de ore, aerob, la 37°. Deseori se poate obține o dezvoltare mai bogată a streptococilor, dacă se incubează anaerob, ceea ce are un efect favorabil asupra creșterii streptococilor și inhibitor asupra stafilococilor, *Neisseria*, *B. pertussis*, și *C. diphtheriae*. Incubarea anaerobă facultativă în cazul exsudatelor faringiene, însoțită de incubarea în atmosferă cu CO_2, este obligatorie pentru secreții vaginale, hemoculturi sau alte produse izolate din cavități închise.

Cînd dorim inhibarea completă a stafilococului, folosim mediul geloză-sînge + cristal violet 1/500 000.

Însămînțarea în profunzime creează condiții de semianaerobioză, ceea ce permite izolarea streptococilor microaerofili din diferite produse patologice și obținerea unei hemolize nete.

b) *Metoda plăcilor turnate* este folosită îndeosebi pentru însămînțarea produselor lichide. Pe fundul unei plăci Petri sterile se pune o cantitate măsurată (0,5—1 ml) de produs ca atare sau diluat, peste care se toarnă un strat de geloză-sînge. Se amestecă. Se lasă să se solidifice.

Metoda permite totodată și o apreciere a concentrației germenilor în produsul respectiv, fiind indicată în hemoculturi, în special.

c) *Metoda între două straturi* se folosește pentru însămînțarea tampoanelor din cavități închise. Pe suprafața unei plăci cu geloză se descarcă și se diseminează tamponul, după tehnica descrisă. Se toarnă deasupra un strat subțire de geloză-sînge, adusă la 48°.

d) *Însămînțarea prin îmbogățire* se folosește pentru produsele paucimicrobiene (purtătorii de streptococi hemolitici sau cînd însămînțarea nu se poate face în primele ore la recoltare). Mediul utilizat avînd calități selective, poate fi folosit și pentru produsele intens contaminate cu diverși alți germeni.

După recoltare, tamponul este introdus în mediul de îmbogățire, incubat 5—18 ore la 37° și diseminat apoi pe placa cu geloză-sînge.

Pentru grăbirea diagnosticului se poate pune pe placa însămînțată direct cu produsul respectiv, în zona descărcării tamponului, o rondelă de hîrtie de filtru îmbibată într-o soluție de 5 u./ml bacitracină.

4. *Citirea plăcilor și notarea rezultatelor.* După 18—24 de ore de incubație, coloniile de streptococi hemolitici sînt mici, transparente sau translucide, cu un halo de hemoliză în jur. Hemoliza este clară, cu margini bine definite, cu diametrul de 2—3 ori mai mare decît diametrul coloniei. Se deosebesc de stafilococii α-hemolitici prin mărimea și aspectul coloniei.

Streptococ: colonie mică, transparentă sau translucidă, hemoliză mare clară în jur, cu margini net delimitate.

Stafilococ: colonie mare, opacă, pigmentată, hemoliză mică.

Diferențierea de alți germeni hemolitici: *Haemophilus*, *Corynebacterium* (speciile hemolitice), *Esch. coli* este uneori dificilă, fiind necesară efectuarea unui frotiu colorat Gram, pentru precizarea diagnosticului de specie.

5. *Repicarea* este operația prin care, sub lupă, 3—4 colonii de același aspect se repun în mediu bulion glucozat sau mediu Tiem 2%. Aspectul culturii în bulion este caracteristic. După 18—20 de ore, bulionul rămîne limpede, iar streptococul se prezintă sub formă de grunji fini sau floconoși, care se depun pe pereți sau la fundul tubului.

6. *Trecerea pe placa de control* se face din bulion glucozat, trecînd cu ansa în striuri paralele. După notarea hemolizei și morfologiei coloniei, tulpina se repică în bulion-sînge pentru conservare. Se păstrează 3—4 luni la +4°.

I. *Identificarea streptococului piogen*

1. *Identificarea de grup.* Există numeroase metode de grupare a streptococilor hemolitici, bazate, fie pe identificarea poliozidului specific de grup, fie pe comportarea diferită la substanțe variate. Cunoaștem în prezent:

a) metoda serologică bazată pe
  - reacția de precipitare
  - reacția de aglutinare

b) metoda anticorpilor fluorescenți

c) metode fiziologice
  - metoda cu bacitracină
  - metoda cu maltoză

Identificarea grupului prin reacția de precipitare constituie metoda cea mai fidelă. Ea constă din 2 timpi:

— primul timp: prepararea extractului (a poliozidului specific de grup);

— al doilea timp: reacția de precipitare între poliozidul extras și serurile specifice de grup, preparate pe iepuri.

Substanța specifică de grup se poate extrage din corpii microbieni în întregime sau numai din pereți, prin diferite metode:

a) tratare cu acid clorhidric la 100° — metoda Lancefield;

b) tratare cu formamidă la 160° — metoda Fuller;

c) tratare cu enzime provenind din filtratul culturilor de *Streptomyces albus* — metoda Maxted;

d) prin tratare cu enzima liberată în timpul lizei bacteriofagice a streptococilor grup C;

e) prin dezintegrare cu ultrasunete și prin digestia pepsică a streptococilor broaiați;

f) prin autoclavarea streptococilor timp de 2 ore, la 127° — metoda Thulin, Rantz și Randall.

Dintre toate aceste metode, prima constituie metoda de largă utilizare.

Prepararea extractului prin metoda Lancefield. Un tub de cultură de 18 ore, în bulion glucozat, a tulpinii de identificat se centrifughează, se decantează și la depozitul microbian se adaugă 0,5 ml HCl, soluție N/5 în ser fiziologic. Se introduce în baia de apă care fierbe, menținîndu-se timp de 10 minute. Se răcește brusc. După centrifugare, supernatantul, neutralizat cu o soluție de NaOH N/5 în ser fiziologic, în prezența unei picături de albastru de bromtimol, pînă la culoarea albastru-verde, reprezintă poliozidul specific de grup.

Reacția de precipitare se poate executa, fie în tuburi de precipitare cu diametrul de 6 mm, fie în tuburi capilare.

În tuburi de precipitare se repartizează cîte 0,2 ml extract și 0,1 ml ser specific (lăsînd să curgă încet pe peretele tubului). În cazul unui streptococ hemolitic izolat din exudatul faringian, precipitarea extractului se va face în prezența seturilor A, C și G.

Tuburile se lasă pe masă la temperatura camerei timp de 10—20 de minute și apoi se notează prezența inelului de precipitare. După agitare, tuburile se țin 2 ore la 37°, la ghețar peste noapte, iar a doua zi se face citirea definitivă, notîndu-se precipitatul depus pe fundul tubului. Un disc compact de precipitare reprezintă intensitatea maximă și se notează cu ++++D.

Reacția de precipitare în tuburi capilare se efectuează introducînd un capăt al tubului în extract, apoi în serul specific și implantîndu-l în plastilină. Timpii următori sînt identici, minus agitarea.

Metoda anticorpilor fluorescenți este o metodă superioară în ceea ce privește rapiditatea diagnosticului. Ea permite deseori punerea în evidență a streptococului piogen, direct, pe frotiurile din exsudatul faringian, făcînd posibil totodată și un diagnostic negativ prin identificarea streptococilor de alte grupuri.

Metoda cu bacitracină se bazează pe observația lui Maxted, după care streptococul piogen este deosebit de sensibil la bacitracină, spre deosebire de streptococii hemolitici aparținînd grupurilor C și G, rezistenți.

Metoda constă din însămînțarea pe geloză-sînge, în masă, a streptococului de identificat și plasarea în mijlocul ariei însămînțate a unei rondele îmbibate într-o soluţie conţinînd 5 u/ml sau bacitracină încorporată în amidon, conţinînd 250 u/g.

În cazul unui streptococ de grup A, apare în jurul bacitracinei o zonă de inhibiţie, care nu se observă la streptococii aparţinînd altor grupuri Lancefield. Metoda permite identificarea streptococului hemolitic grup A în 98% din cazuri. Pentru aceste motive, metoda cu bacitracină este utilizabilă cînd metoda serologică este greu practicabilă.

2. *Identificarea de tip.* Pentru un studiu epidemiologic complet este absolut necesară identificarea de tip a streptococilor grup A, bazată pe evidenţierea unuia sau altuia din principalele antigene specifice de tip M şi T.

Identificarea de tip pe baza antigenului M se face printr-o reacţie de precipitare, punînd în contact un extract acid Lancefield, preparat din tulpina respectivă, cu seruri precipitante, specifice, anti-M.

Identificarea de tip, folosită în mod curent, se practică printr-o reacţie de aglutinare pe lamă, care poate fi datorită ambelor antigene specifice de tip M şi T, fie numai antigenului T, cînd se folosesc suspensii tripsinizate.

Metoda este satisfăcătoare pentru cercetările curente, de ordin clinic sau epidemiologic.

II. *Identificarea celorlalţi streptococi afară de streptococii piogeni*

Specii de streptococi hemolitici aparţinînd altor grupuri serologice decît A şi mai ales streptococi din grupurile C şi G pot cauza afecţiuni benigne ale căilor respiratorii sau ale căilor genitale la femeie, iar enterococii şi unele specii de *Str. viridans* provoacă afecţiuni cu localizări variate printre care în primul rînd, endocardita bacteriană subacută, infecţii ale căilor genito-urinare, digestive, biliare etc. şi chiar toxiinfecţii alimentare.

Trei probe de bază sînt necesare pentru orientare în vederea determinării speciilor de streptococi : *1*) producerea de catalază ; *2*) determinarea grupului Lancefield ; *3*) capacitatea de dezvoltare pe agar cu bilă 40%.

1. *Proba catalazei.* Cîteva picături de peroxid de hidrogen 10% se adaugă pe suprafaţa unei culturi de 24 de ore pe geloză simplă sau geloză ser. Proba pozitivă manifestată prin efervescenţă puternică de gaz arată că tulpina nu este streptococ, deoarece speciile genului streptococ sînt caracterizate prin absenţa catalazei.

2. *Reacţia de precipitare* cu ajutorul antiserurilor de grup A, B, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, O, P, Q, R, S permite precizarea apartenenţei la unul din grupurile Lancefield şi diferenţierea de *Str. viridans* propriu-zişi, dat fiind că tulpini cu hemoliză α sînt frecvent întîlnite în interiorul grupurilor Lancefield H, K, M etc.

3. *Dezvoltarea pe agar cu bilă* 40% este caracteristică enterococilor, streptococilor lactici şi unor specii de *Str. viridans* de origine animală.

Identificarea speciilor de enterococi. Importanţa enterococilor (streptococi grup D) în patologia umană, cît şi rolul lor de indicatori sanitari, în cazul controlului bacteriologic al apelor sau al preparatelor de alimente conservate, impune necesitatea identificării speciilor de enterococi.

Grupul enterococilor întrunește germeni dotați cu caractere remarcabile de rezistență la condiții de mediu care nu permit dezvoltarea celorlalți streptococi (pH și salinitate ridicată, termorezistență, dezvoltare la temperaturi extreme etc.). Prezența carbohidratului de grup D alături de celelalte proprietăți fac din enterococi un grup bine definit.

În tabelul XIV sînt redate caracterele fiziologice ale speciilor de enterococi actualmente recunoscute.

Tabelul XIV

Unele caractere fiziologice ale streptococilor D (După Shattock, 1955, cu completări)

Caractere	*Str. faecalis*	*Str. faecalis* var. *zymogenes*	*Str. faecalis* var. *liquefaciens*	*Str. faecium*	*Str. durans*	*Str. bovis*
Hemoliză β	–	+	–	–	+/–	–
Dezvoltare la:						
10°	+	+	+	+	–	–
45°	+	+	+	+	+/(–)	+
pH 9,6	+	+	+	+	+/–	–
NaCl 6,5%						
Bilă 40%	+	+	+	+	+	+
Rezistență 30 de minute la 60°	+	+	+	+	+	–
Reducere puternică a laptelui turnesolat	+	+/–	+	–	–	–
Lichefierea gelatinei	–	+/–	+	–	–	–
Manitol	+	+	+	+/–	–	–/+
Sucroză	+	+	+	+/–	–	+
Rafinoză	–	–	–	–/(+)	–	+
Sorbitol	+	+	+	–/(+)	–	–
Arabinoză	–	–	–	+	–	+/–
Telurit K 1/2 500	+	+	+	–	–	–
Tirozindecarboxilază	+	+	+	+/–	±	–
Producere de dextran	–	–	–	–	–	+

Legendă:

+/– = rezultate variabile cu tulpina.
–/(+) = tulpini pozitive ocazional.
+/(–) = tulpini negative ocazional.
± = activitate decarboxilazică moderată.

Pînă în prezent au fost identificate în interiorul grupului D, patru specii cu două varietăți. *Str. faecalis*, *Str. faecalis* var. *zymogenes*, *Str. faecalis* var. *liquefaciens*, *Str. faecium*, *Str. durans* și *Str. bovis*.

Deși toate speciile de enterococi menționate pot fi întîlnite în tubul digestiv și cavitățile deschise ale omului, se admite în general că specia *Str. faecalis* cu variantele ei reprezintă enterococi umani, iar celelalte specii, mai ales enterococi animali.

După cum se constată din tabelul XIV, toate speciile de enterococi se dezvoltă la 45° și pe medii cu 40% bilă. Cu excepția *Str. bovis*, toate speciile se dezvoltă la 10°, pH 9,6, bulion cu 6,5% NaCl și rezistă 30 de minute la 60°.

Specia *Str. faecalis* formează grupul cel mai omogen, varietățile *zymogenes* și *liquefaciens* deosebindu-se numai prin proprietățile hemolitice și proteolitice.

Teluritul de potasiu în concentrație de 1/2 500 permite dezvoltarea speciei *Str. faecalis* cu cele două varietăți și inhibează speciile *Str. faecium*, *Str. durans* și *Str. bovis*.

Prezența tiroxincarboxilazei este de asemenea constantă la *Str. faecalis* și rară la celelalte specii.

Specia *Str. faecium* se caracterizează prin : nefermentarea sorbitolului și fermentarea arabinozei, prin reducerea slabă a laptelui turnesolat și incapacitatea de a se dezvolta în prezența teluritului de potasiu.

Specia *Str. durans* manifestă absența capacităților reducătoare și fermentative.

Specia *Str. bovis* fermentează caracteristic rafinoza și produce dextran pe mediile cu zaharoză.

Alături de speciile recunoscute de enterococi sînt adesea întîlnite tulpini cu caractere atipice, greu de clasificat.

Ciucă, Baldovin-Agapi și colab. au izolat un număr de bacteriofagi enterococici din condiții ecologice variate, cu o remarcabilă specificitate de specie. Pe baza studiului serologic, acești fagi au fost împărțiți în IV grupe, care permit o diferențiere rapidă a speciilor de enterococi ziși umani (*Str. faecalis*), de speciile animale (*Str. faecium* și *Str. durans*).

Grupul *Str. viridans* întrunește în prezent 8 specii. Absența capacităților β-hemolitică și reducătoare și lipsa de rezistență la condițiile de mediu (salinitate, pH) sînt caracteristice pentru aceste specii. Unele se pot dezvolta la 45° sau 10° și rezistă la 60° (vezi tabelul XV).

Speciile *Str. salivarius*, *Str. mitis*, *Str. sanguis* și *Str. MG* fac parte din flora bucală normală. Primele trei specii sînt implicate în infecțiile dentare și în etiologia endocarditei lente maligne. Celelalte specii, de origine animală, prezente de obicei în lapte, sînt întîlnite și în cavitatea bucală a omului. *Str. thermophilus* și *Str. acidominimus* au utilizare în industria preparatelor lactate (iaurt, brînzeturi), iar *Str. uberis* produce cazuri sporadice de mastită la bovidee.

Str. viridans sînt singurii la care nu s-au pus în evidență, pînă în prezent, substanțe cu specificitate de grup, deși polizaharizi cu specificitate de tip, situați în capsulă, au fost descriși la *Str. salivarius* și *Str. MG*. Tulpini aparținînd unora din aceste specii posedă antigene comune cu unele din grupurile Lancefield ; *Str. salivarius* cu grupul K, *Str. sanguis* cu grupul H și *Str. uberis* cu grupul E. În cadrul diferitelor specii au fost identificate tipuri serologice.

Capacitatea de a elabora enzime capabile să polimerizeze zaharoza în polizaharizi de tipul levan sau dextran constituie un criteriu important de diferențiere a speciilor *Str. salivarius* și *Str. sanguis*. *Str. salivarius* sintetizează levan pe geloză, conținînd 5% zaharoză, după incubație obișnuită.

Str. sanguis și streptococii grupului H Lancefield sintetizează dextran pe același mediu incubat în anaerobioză și gelifică bulionul cu zaharoză. Identificarea levanului și a dextranului se face atît prin aprecierea aspectului coloniilor pe medii solide cu zaharoză, cît și prin reacții serologice. Dextranul precipită la diluții întinse, în prezența serului antipneumococic de tipul al II-lea cît și cu serurile specifice antidextran preparate cu tulpini de *Leuconostoc* sau de streptococi formatori de dextran. Levanul precipită în prezența serurilor antilevan și nu precipită cu serurile antidextran și antipneumococic de tipul al II-lea.

B. **Diagnosticul serologic.** Constă în punerea în evidență în serurile bolnavilor suferind de infecții streptococice a anticorpilor antistreptococici, antimicrobieni sau antitoxici.

Tot prin metode serologice se pot evidenția în primele zile de boală prezența antigenelor streptococice (precipitogenului) în diferite produse patologice (urină, spălătură faringiană). Autori ca Gressi și Edelman, Lipkin și Sendik, Reznik și Mansurova au dat acestei metode o utilizare și o importanță deosebită în diagnosticul precoce al infecțiilor streptococice. Reacția se poate face punînd în contact filtrate de urină sau de spălătură faringiană provenind de la bolnavi din primele zile de boală, cu seruri de convalescent de scarlatină sau seruri antistreptococice.

Din pricina numeroaselor tipuri de streptococi de grup A și a prezenței anticorpilor specifici la persoanele sănătoase, metodele de evidențiere a anticorpilor antimicrobieni (aglutinine, hemaglutinine, precipitine, opsonine) nu pot constitui teste de diagnostic ușor practicabile și interpretabile.

Cercetarea anticorpilor antitoxici (antistreptolizină „O", antistreptokinază, antihialuronidază, antiproteinază) s-a dovedit mai eficientă sub acest aspect. În special, proba antistreptolizinelor „O" constituie astăzi o metodă standardizată, utilizată curent pentru diagnosticul infecțiilor streptococice. Pentru efectuarea acestei reacții sînt necesare : serul de cercetat, hematiile de iepure, streptolizina „O", soluția-tampon.

1. Serul recoltat steril, limpede și nehemolizat se poate păstra la +4°. În ziua reacției se inactivează 30 de minute la 56°.

2. Hematiile de iepure recoltate pe perle, din vena marginală a urechii, se spală, se readuc la volumul inițial și se utilizează în soluție clorurată izotonică.

3. Streptolizina „O" este un antigen stabil, cu condiția de a fi păstrată la +4°. Titrul se exprimă în unități combinate. În momentul utilizării streptolizina „O" trebuie activată cu o soluție de cisteină tamponată.

4. Soluția-tampon, pentru dizolvarea cisteinei, are următoarea formulă : ClNa 4,2 g ; KH_2PO_4 3,17 g ; $Na_2HPO_4 + 12H_2O$ 3,58 g sau $Na_2HPO_4 + 2H_2O$ 1,79 g ; apă distilată 1 000 ml, pH = 6,5. Se adaugă apoi 1,6 g NaOH ; pH final 8.

Efectuarea reacției. Se fac diluții 1/10, 1/100 și 1/500 din serul de cercetat. Se repartizează cantități descrescînde, conform tabelului XV.

Se completează cu soluție clorurată izotonică pînă la 1 ml, se adaugă în fiecare tub al reacției o unitate combinată de streptolizină „O", activată cu cisteină, în volum de 0,5 ml, diluată conform titrului menționat pe fiolă, de exemplu o streptolizină „O", cu titrul 0,20 ml, din diluția 1/8, se va dilua 1/8 cu soluție clorurată izotonică. Pentru fiecare tub al reacției se va socoti 0,20 ml din streptolizina astfel diluată și 0,30 ml (diferența pînă la volumul 0,5 ml) soluție cisteină tamponată 0,6%. Ambele soluții se lasă în contact la temperatura camerei 10 minute, timp necesar pentru activarea streptolizinei „O". Se repartizează apoi cîte 0,5 ml. Tuburile se mențin în baie, la 37°, timp de 15 minute. Se repartizează

Tabelul XV

Diluții ser	1/10		1/100					1/500				
Ser bolnav (ml)	0,8	0,2	1	0,8	0,6	0,4	0,3	1	0,8	0,6	0,4	0,2
Soluție clorurată izotonică (ml)	0,2	0,8	—	0,2	0,4	0,6	0,7	—	0,2	0,4	0,6	0,8
Streptolizină „O" (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
15 minute la baie 37°												
Hematii 5% (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
45 minute la baie 37°												
Unități ASLO	12	50	100	125	166	250	333	500	625	833	1250	2 500

cîte 0,5 ml soluție hematii 5%. După agitare, tuburile se lasă la baie încă 45 de minute. Se face o primă citire imediată și a doua după menținerea peste noapte la +4°. Ultimul tub în care hemoliza lipsește complet ne indică titrul exprimat în unități/ml.

C. **Diagnosticul biologic.** 1. *Reacția Dick* constă din injectarea unei doze reactive cutanate în volum de 0,1 ml toxină streptococică, de preferat purificată, intradermic, în regiunea anterioară a antebrațului. La mîna opusă se injectează aceeași cantitate din toxină fiartă 2 ore, la 100° (martor). O reacție pozitivă trebuie să depășească în diametru 10/10 mm după 24 de ore.

La începutul bolii se întîlnesc 60% bolnavi Dick-pozitivi, pentru ca în convalescență să mai rămînă numai 1—5% pozitivi.

2. *Fenomenul de stingere Schulz-Charlton.* a) *Metoda directă* se bazează pe faptul că erupția din primele zile de boală este stinsă în 70—100% din cazuri de serul convalescenților de scarlatină, serul a 60% din adulții normali sau serul antitoxic. Metoda constă din inocularea, pe cale intradermică, în plin eritem scarlatinos, a 0,2 ml ser de convalescent de scarlatină, ser de adult sau ser antitoxic preparat pe cal. După 18—24 de ore se observă o dispariție locală a eritemului scarlatinos. Reacția este negativă în eritemele de altă natură.

b) *Metoda indirectă*: serul din primele zile de boală nu neutralizează eritemul sigur scarlatinos. Dacă stinge eritemul, serul nu provine de la un caz de scarlatină din primele zile de boală.

Există un raport invers între capacitatea de stingere și reacția Dick. În primele zile, fenomenul de stingere indirect este negativ și reacția Dick pozitivă. În convalescență, fenomenul de stingere indirect devine pozitiv, iar reacția Dick se negativează.

Baldovin și colaboratorii stabilesc oarecare relații de paralelism între capacitatea de stingere și titrul antistreptolizinelor „O".

În prezent nu se recomandă utilizarea acestor reacții, pentru evitarea transmiterii hepatitei epidemice prin ser.

Interpretarea rezultatelor. Pentru o justă interpretare a datelor obținute prin examenele de laborator este absolut necesar ca acestea să fie coroborate cu datele clinice și epidemiologice.

Dat fiind frecvenţa stării de purtare a streptococului, mai cu seamă în anotimpurile reci, singura prezenţă a streptococului hemolitic în exsudatul faringian nu este suficientă pentru punerea unui diagnostic de infecţie streptococică. Însoţit însă de semne clinice şi epidemiologice, prezenţa lui ne va pune pe calea diagnosticului cert de infecţie streptococică, indicînd totodată metoda de tratament.

În cazurile în care tratamentul cu antibiotice a început să fie instituit înainte de recoltarea produsului patologic, un rezultat bacteriologic negativ nu va fi luat în consideraţie, decît dacă concordă cu celelalte date (clinice, serologice şi epidemiologice).

În interpretarea rezultatelor antistreptolizinelor ,,O'' vom ţine seama de titrul limită. În condiţiile ţării noastre, limita normală este considerată 200 u./ml. Titrurile care depăşesc această cifră indică cu certitudine o infecţie streptococică recentă în antecedentele bolnavului.

În scarlatină, titrul antistreptolizinelor ,,O'' este scăzut în prima săptămînă de boală, pentru ca începînd din săptămîna a 2-a titrul să crească rapid şi la valori mari (1 200, 2 500 u./ml). În săptămîna a 4-a, titrul rămîne staţionar sau începe să scadă. Proba are o importanţă deosebită ca test de diagnostic retrospectiv în formele inaparente.

Titruri foarte mari şi patognomonice se întîlnesc şi în alte afecţiuni streptococice, de exemplu în reumatism la copii, coree, glomerulonefrită, streptococii cutanate etc.

În interpretarea rezultatelor trebuie luat în consideraţie tratamentul cu antibiotice, mai ales cînd acesta este instituit din primele zile de boală. În acest caz, titrurile sînt mai puţin ridicate şi numai cercetarea în dinamică este capabilă să dea interpretarea justă.

Medii de cultură

Mediile cele mai frecvent utilizate sînt :

Geloza-sînge, care este o geloză 2% topită, readusă la 50° la care se adaugă sînge defibrinat de cal sau de berbec 8—10%. După omogenizare se toarnă în plăci Petri, într-un strat subţire.

Geloza-sînge cu cristal violet. La geloza-sînge descrisă mai sus se adaugă dintr-o soluţie sterilă de cristal violet, pentru a obţine o concentraţie finală 1/500 000.

Mediul de îmbogăţire are următoarea compoziţie : la 100 ml bulion glucozat 0,02% se adaugă în mod steril 5 ml sînge defibrinat, de cal sau berbec, 5 ml dintr-o soluţie de cristal violet 1/25 000 şi 7,5 ml soluţie azotură de sodiu (azid) 1/1 000. Se repartizează cîte 2 ml din acest amestec în tuburile prevăzute cu tampoane sterile. Amestecul se poate păstra timp de cîteva zile la +4°.

Bulionul-sînge. La tuburile cu bulion simplu, preparat după formula de mai sus, se adaugă 2 picături de sînge defibrinat de cal sau de berbec, pentru fiecare tub. Se utilizează după 48 de ore de control la 37°.

Epidemiologie

Scarlatina şi angina streptococică, boli ce afectează cu predilecţie copilul, îmbracă în ţările din zona temperată, un caracter endemo-epidemic, cu cazuri sporadice în timpul verii şi exacerbări în lunile de toamnă-iarnă. La intervale de 5—7 ani se înregistrează de obicei valuri epidemice cu un număr mare de cazuri. Apariția valurilor epidemice se explică prin acumularea unui contingent de populație receptivă (copii) în intervalul dintre două epidemii.

Posibilitatea de a face boala este determinată de infectarea cu un streptococ epidemic—toxigen și este legată de gradul de răspîndire în colectivitate a acestui streptococ. Felul îmbolnăvirii depinde de starea de imunitate (antitoxică și antimicrobiană) a celor expuși la infecție adică de factorul gazdă. Persoanele cu imunitate bacteriană, indiferent de imunitatea antitoxică, pot elimina rapid streptococii sau îi rețin în rino-faringe, pentru o perioadă variabilă de timp, fără a face boala clinică. Este vorba de purtătorii sănătoși. La cei care nu posedă o imunitate antibacteriană, felul îmbolnăvirii depinde de imunitatea antitoxică: cei cu reacția Dick negativă fac amigdalită-faringită (*scarlatina sine exanthemata*), iar cei cu reacția Dick pozitivă fac infecția cu erupție adică scarlatină tipică. Din punct de vedere epidemiologic, toate aceste trei categorii—purtătorii sănătoși, cazurile de angină și cele de scarlatină — reprezintă surse de răspîndire a streptococilor patogeni. Eliminatorii cei mai periculoși sînt constituiți de purtătorii nazali care răspîndesc cantități considerabile de germeni în mediu.

Condițiile de viață în comun (creșe și cămine de zi, școli, internate, cazărmi) reprezintă factori favorizanți ai răspîndirii infecțiilor streptococice. Infecțiile streptococice (angină, scarlatină) pot fi transmise și pe cale alimentară, prin lapte sau alte alimente contaminate cu streptococi piogeni. Sursa de contaminare a laptelui poate fi animalul suferind de o mastită cu streptococi grupa A, dar cel mai adesea infectarea animalului se face de la cei care îl mînuiesc (mulgători, lăptari) suferinzi de o infecție streptococică acută (angină, scarlatină, sinuzită, panarițiu). În țara noastră au fost descrise asemenea izbucniri, de Baldovin-Agapi.

Enterococii și streptococii α-hemolitici sînt incriminați ca agenți etiologici ai unor izbucniri de toxiinfecții alimentare, după ingerarea de alimente în care acești germeni au avut posibilitatea să se dezvolte în număr excesiv.

Metoda serotipajului streptococilor piogeni (Griffith și Lancefield) a contribuit într-o măsură evidentă la aprofundarea mecanismului epidemiologic al infecțiilor streptococice. În țara noastră, cercetările făcute din 1936 pînă în prezent au arătat că streptococul A_{10} a fost răspunzător de epidemiile din 1936—1938, din România și Bulgaria. În anii 1950 și 1958 a fost întîlnit tipul epidemic de streptococ A_1, întîlnit în 65—90% din cazurile de scarlatină. Tipurile endemice A 4/24/29, A_{25} și A_6 predomină în perioada dintre epidemii (Ciucă. Baldovin-Agapi și colaboratorii).

Din cercetările făcute concomitent în U.R.S.S. (Ioffe, 1948; Teitelbaum și Levina, 1948; Kitcenko, 1952), Ungaria, Cehoslovacia și Polonia reiese că epidemiile de infecții streptococice din aceste țări se datoresc acelorași tipuri de streptococi hemolitici.

Măsurile de combatere a infecțiilor streptococice constau în: 1) izolarea sursei de infecție; 2) chimioprofilaxia aplicată în focar; 3) combaterea rezervorului secundar din mediu.

Genul Diplococcus

Dr. Coralia Baldovin-Agapi

Pneumococul și infecțiile pneumococice

Diplococcus pneumoniae (pneumococul) germen cu habitat și tropism pentru căile respiratorii superioare ale omului și animalelor, formează un gen aparte în tribul *Streptococceae* al familiei *Lactobacilaceae*.

Istoric. Pneumococii au fost semnalați pentru prima oară de către Krebs (1875). Pasteur, Chamberland, Roux (1881) și Sternberg (1881) au obținut septicemii pneumococice la iepuri care fuseseră inoculați cu salivă recoltată de la cazuri de rabie și de la indivizi sănătoși. Weichselbaum (1886) și Frankel (1886) i-au izolat din sputa bolnavilor de pneumonie, considerîndu-i agenți etiologici ai acestei afecțiuni.

Habitat. Pneumococii sînt saprofiți obișnuiți ai căilor respiratorii superioare ale omului și animalelor; 25—70% din persoanele normale găzduiesc în rino-faringe pentru perioade variabile pneumococi aparținînd diferitelor tipuri serologice.

Dintre speciile animale, caii, viței, cîinii, pisicile, maimuțele, cobaii și șobolanii, sînt purtători de pneumococi.

Caractere morfologice. Morfologia caracteristică de coci alungiți, lanceolați, rar sferici, de 0,5—1,25 μ diametru, dispuși în diplo sau lanțuri scurte. Imobili, nesporulați, variantele virulente posedă capsulă. Gram-pozitivi în culturile tinere. După 24—48 de ore apar forme de involuție și pierd proprietatea de a reține colorația Gram.

Caractere de cultură. Pneumococii se dezvoltă greu sau de loc pe mediile simple. Necesită pentru dezvoltare aceiași aminoacizi, ca și streptococii grupului A, dintre care glutamina și asparagina sînt esențiali. Factorii accesorii de creștere sînt constituiți de: biotină, acid nicotinic, acid pantotenic, colină, pirimidină, tiamină, adenină, uracil. Sursa principală de energie este constituită de glucoză. Inițierea creșterii este condiționată de prezența CO_2 (adăugare de bicarbonat de sodiu) și de un potențial de oxidoreducere scăzut, care se obține cu ajutorul agenților reducători (cisteină, acid tioglicolic). În practică, aceste cerințe nutritive sînt asigurate de mediile peptonate, preparate cu carne proaspătă, la care se adaugă ser, ascită, sau sînge defibrinat. Sîngele este util pentru conservarea culturilor în laborator, catalaza din hematii inactivînd peroxizii acumulați din dezvoltarea germenilor.

Temperatura optimă de dezvoltare este 37°, iar pH optim 7,6—7,8.

Mediile lichide sînt tulburate uniform, cu tendința la depozitare, mai ales după acidifiere (medii glucozate).

Pe mediile solide cu sînge, coloniile sînt mici, de 0,5—1,5 mm diametru, însoțite de o zonă verde de hemoliză. Aspectul coloniilor variază cu faza de disociație și este în raport cu structura antigenică. Griffith desemna prin „S'' coloniile variantelor virulente încapsulate și prin „R'' variantele neîncapsulate, lipsite de virulență. Prin obținerea de către unii autori a unor colonii cu caracter rugos accentuat, denumirea variantelor a fost modificată astfel: varianta încapsulată virulentă, mucoidă, corespunzătoare formei „S'' Griffith, este denumită forma „M''; forma „R'' Griffith primește denumirea de „S'', iar termenul de „R'' este rezervat pentru variantele net rugoase și degradate antigenic.

Caractere biochimice și de metabolism. Pneumococii sînt aerobi și anaerobi facultativ. Principala sursă de energie—glucoza—este metabolizată pe cale anaerobă cu producere finală de acid lactic. Pneumococii nu posedă citocrom, catalază sau peroxidază. Dezvoltarea bună, în condiții aerobe, este posibilă datorită fixării oxigenului printr-un sistem enzimatic conținînd flavină. Peroxidul de hidrogen, rezultat din autooxidarea flavoproteinei reduse, se acumulează în mediu, din lipsa catalazei sau peroxidazei. Prezența sîngelui în mediile de cultură împiedică acumularea H_2O_2 prin aportul de catalază. Mediile cu sînge încălzit (mediu șocolat), în care catalaza a fost inactivată, sînt decolorate de H_2O_2.

Pneumococii elaborează diverse enzime zaharolitice, proteolitice și lipolitice.

Acțiunea enzimelor zaharolitice se manifestă prin fermentarea a numeroase zaharuri (glucoză, maltoză, lactoză, zaharoză, rafinoză, manitol etc.). Capacitatea de a fermenta *inulina* este caracteristică pentru acești germeni, dar poate fi întîlnită și la unele specii de *Str. viridans*.

Enzimele proteolitice și lipolitice sînt răspunzătoare de autoliza germenilor în culturile vechi. Enzima proteolitică este distrusă la 60° și după Sturdza este inactivată de razele ultraviolete. Germenii omorîți la 60° nu mai prezintă fenomenul de autoliză, datorită inactivării enzimelor. Autoliza are loc, dacă la germenii încălziți se adaugă enzime extrase din germeni sau culturi autolizate care conțin aceste enzime.

Fenomenul de biloliză, descris de Neufeld (1900), se manifestă prin clarificarea (autoliza) culturilor de pneumococi, la adăugarea de bilă sau săruri biliare.

Lămurirea relațiilor dintre cele două fenomene a necesitat numeroase studii, la care Sturdza a adus contribuții originale. În esență, bila, sărurile și acizii biliari, ca și o serie de alți agenți (cloroformul, săpunurile, acizii grași, chinina etc.) acționează ca factori inductori ai autolizei. Ei exercită asupra germenilor o acțiune bactericidă, urmată de modificări ale structurii celulare, cu punerea în libertate a numeroase enzime care duc la o degradare mai mult sau mai puţin accentuată a proteinelor, nucleo-proteinelor, lipidelor şi polizaharizilor microbieni.

Dacă absenţa de catalază şi capacitatea homofermentativă sînt comune pneumococilor şi streptococilor, biloliza este caracteristică pneumococilor şi permite diferenţierea lor de *Str. viridans*.

Pneumococii secretă în mediile lichide o hemolizină ,,oxigenabilă”, asemănătoare cu cea a streptococilor hemolitici, *Cl. tetani* sau *Cl. welchii* iar pe mediile solide manifestă o acţiune hemolitică de tip α (*viridans*).

Rezistenţa la agenţi fizici, chimici şi biologici. Pneumococii pot supravieţui timp de cîteva luni în sputa uscată la întuneric. Viabilitatea este tot atît de îndelungată în organele (splină, ficat) şoarecilor morţi cu septicemie, păstrate la exsicator pe $CaCl_2$, în organismul şoarecilor morţi menţinuţi la frigider la —70° sau în culturile liofilizate. În culturile pe medii glucozate, netamponate, mor după cîteva zile, datorită scăderii de pH prin acumularea de acid lactic şi autoliză.

Temperatura de 52° îi omoară în 10 minute, lumina solară în timp de o oră, iar lumina difuză în 1 1/2 oră.

Sînt mai sensibili decît streptococii şi stafilococii la acţiunea dezinfectantelor şi, în mod special, la săpunuri, bilă, oleat de sodiu, coloranţi şi unii derivaţi de chinină. Optochinul (etilhidrocupreina) este bactericid pentru pneumococi, în concentraţie de 1/500 000—1/1 000 000, iar pentru streptococi în concentraţie de 1/5 000.

Sensibili la acţiunea bacteriostatică a sulfamidelor în special a sulfadiazinei, sulfamerazinei şi sulfopiridinei, sînt foarte sensibili la acţiunea bactericidă a penicilinei, aureomicinei, cloramfenicolului şi teramicinei.

Structura antigenică. Încă din 1897, Bezançon şi Griffon au arătat că există diferenţe serologice între pneumococi. Neufeld şi Bändel (1909) au atras atenţia asupra multiplicităţii tipurilor indentificînd 2 tipuri principale (I şi II). Dochez şi Avery au distins în 1915, tipurile I, II, III şi un grup IV eterogen. Cooper şi Walter au diferenţiat 29 de tipuri în interiorul grupului IV. Kauffmann, Morch şi Schmidt, precum şi Morch-Lund au adăugat peste 40 de tipuri, astfel că numărul tipurilor de pneumococi cunoscute pînă în prezent se ridică la 80.

Studiile făcute de Avery, Heidelberger şi Goebel au arătat că specificitatea de tip a pneumococilor se datoreşte unor polizaharizi polimerizaţi, situaţi în capsulă, imunologic distincţi pentru fiecare tip.

După datele acumulate, structura antigenică a pneumococilor se aseamănă mult cu cea a streptococilor, cu deosebirea că la pneumococi antigenul capsular joacă rolul esenţial. Pneumococii apar constituiţi din următoarele fracţiuni antigenice:

—Substanţa de bază a celulei microbiene este o nucleoproteină specifică de specie şi înrudită cu substanţa ,,P” a streptococilor.

—Substanţa glucidică ,,C” descrisă de Tillett şi Francis (8), situată tot în celula microbiană şi comună tuturor pneumococilor este analogă cu polizaharizii specifici de grup ai streptococilor.

—Substanţele ,,M” cu specificitate de tip, situate spre suprafaţa celulei, sînt asemănătoare cu cele de la streptococi, dar imunologic distincte. Sînt prezente atît la formele incapsulate, cît şi la cele fără capsulă.

Tipurile după substanța „M" sînt uneori identice cu tipul capsular, dar diferă în multe cazuri.

Atît polizaharidul somatic C, cît și substanțele „M" nu au rol în patogenitatea germenului.

—Capsula este constituită de polizaharizi, denumiți SSS (substanțe specifice solubile) din cauza solubilității și difuzibilității lor deosebite atît în mediile de cultură, cît și în țesuturile și umorile (sînge, urină) bolnavilor de pneumonie sau ale animalelor infectate experimental.

Polizaharizii diferitelor tipuri de pneumococi se deosebesc în ceea ce privește structura chimică (rotația optică, conținutul în azot, capacitatea reducătoare după hidroliză și zaharurile identificate). Unitatea de bază a polizaharidului de tip I este constituită dintr-un trizaharid conținînd 2 molecule de acid uronic și un aminozahar. Polizaharidul tipului II este compus din glucoză și acid aldobionic (glucoză+acid glucuronic), iar substanța SSS a tipului III este constituită din acid aldobionic.

Polizaharizii unora dintre tipurile de pneumococi prezintă înrudiri cu substanțe similare de la alți germeni. Astfel, polizaharidul tipului II dă reacții încrucișate cu dextranii polizaharidului *B. friedländeri* B și al lui *Saccharomyces cerevisiae*; substanța SSS a tipului XIV este asemănătoare cu antigenul grup A sanguin, iar a tipului XXXV cu antigenul somatic „O" din *Salmonella kirkee* etc.

Substanțele SSS purificate precipită la diluții întinse în prezența serurilor imune specifice, preparate cu germeni incapsulați, dar nu sînt antigenice ca atare, decît pentru unele animale. Ele se comportă ca antigene la șoarece și la om și ca haptene la iepure.

Supoziția că polizaharidul capsular există „într-o formă antigenică" în celula microbiană intactă (Wadsworth, Dubos) a fost confirmată de Barber, Baldovin, Beloiu și Caffé care au reușit să izoleze din pneumococii tip II, un „complex antigenic" constituit din polizaharidul capsular și acid ribonucleic.

Caracterul de virulență al pneumococilor este datorit polizaharizilor capsulari. Culturile incapsulate în faza „M" sînt virulente pentru om și animal. În serul iepurilor inoculați cu culturi încapsulate omorîte, se găsesc aglutinine, precipitine și anticorpi protectori pentru tipul corespunzător de pneumococ. Pierderea capsulei este însoțită de pierderea virulenței.

Variabilitate. *Variația M—S—R.* Prin cultivarea pneumococilor încapsulați (faza „M") în medii conținînd ser imun specific, se obțin variante „S" neîncapsulate, avirulente. Transformarea inversă se operează prin treceri repetate la animale (șoarece) sau prin treceri, la intervale foarte scurte, pe mediile de cultură.

Transmutația tipurilor. Griffith a reușit să transforme tipurile de pneumococi, inoculînd subcutant la șoareci pneumococi vii neîncapsulați de un anumit tip serologic, împreună cu o suspensie omorîtă de pneumococi încapsulați de alt tip serologic. Alți autori au reușit să transforme tipurile *in vitro* cultivînd pneumococi neîncapsulați în prezența de pneumococi încapsulați, omorîți, sau chiar de polizaharizi izolați pe cale chimică, provenind de la alte serotipuri. Agentul transformator este acidul dezoxiribonucleic al formei încapsulate, care dirijează sinteza polizaharidului de tip respectiv. Transformarea tipurilor de substanță „M" a fost obținută în același mod.

Caractere de patogenitate. Pneumococii reprezintă unul din exemplele clasice în care patogenitatea este datorită, în mod aproape exclusiv, virulenței germenului, adică proprietății de adaptare și multiplicare în țesuturi. Factorul de virulență este reprezentat de capsulă, care imprimă rezistența la fagocitoză, polizaharizii capsulari ca atare, nefiind toxici. Germenii încapsulați sînt virulenți, pe cînd variantele neîncapsulate sînt nevirulente și fagocitabile.

Pneumococii nu secretă o toxină propriu-zisă. În afară de hialuronidază, care are un rol în invazivitate, celelalte substanțe elaborate — hemolizina, leucocidina, substanța purpurigenă — ar ocupa un loc redus în patogenitatea germenului.

Boala la om și animale. Pneumococul este principalul agent etiologic al pneumoniei lobare acute și al bronhopneumoniei, afecțiuni în care este întîlnit în 90% și respectiv 75% din cazuri.

Toate țesuturile și mucoasele organismului pot fi sediul unor infecții pneumococice primare sau al unor localizări secundare pe cale sanguină sau limfatică : angine, sinuzite, otite, meningite, pleurezii, artrite supurate, peritonite, pericardite, endocardite. Poate provoca și septicemii însoțite de endocardită vegetantă (Ciucă și colaboratorii, 1929). Reacția fibrinoasă este caracteristică leziunilor pneumococice (pleurezia, angina pseudomembranoasă, vegetațiile endocardice). Exsudatul purulent este fibrinos, cu reflexe verzui. Supurațiile cu tendință la închistare.

Pneumonia este rar o afecțiune primară. Ea apare de obicei după afecțiuni virotice (gripă, rujeolă), care prin leziunile specifice, scad rezistența normală a mucoaselor căilor respiratorii, sau la indivizi cu organisme debilitate (bătrîni, alcoolici).

Pătrunderea germenului în căile respiratorii se face pe cale aeriană prin picăturile de salivă infectată sau prin inhalare de praf infectat. Localizarea lobară a procesului este explicată prin invaziunea hilară a germenului, de unde trece în spațiile limfatice perivasculare, peribronhiale și septale, și de aici în alveolele pulmonare, provocînd alveolită fibrinoasă, catarală, caracteristică. După unii autori, în faza de debut a pneumoniei există o bacteriemie, pneumococii fiind puși în evidență prin hemocultură, între 25% și 50% din cazuri.

Meningita pneumococică, complicație gravă a otitelor, dădea o letalitate de 90% înainte de apariția sulfonamidelor.

Tipurile de pneumococi I, II, III, sînt întîlnite în peste 50% din cazurile de pneumonie, primele 8 tipuri totalizînd 80% din îmbolnăviri, cu variații în timp și după țară. În infecțiile pneumococice ale copiilor sub 12 ani, tipurile mai frecvent întîlnite sînt : XIV, I, VI, V, VII, XIX.

Topciu și colaboratorii (1956) au găsit la cazurile din București de pneumonie, bronhopneumonie, pleurezie, meningită, angină, următoarele tipuri de pneumococi, în ordinea frecvenței : I, II, VI, XII, VIII.

Dintre animale, maimuțele, cobaiul și șobolanul fac infecții pneumococice spontane, netransmisibile la om, care pot îmbrăca caractere epizootice.

Infecția experimentală. Șoarecele, în special, apoi iepurele, cobaiul și maimuța sînt animale de laborator sensibile la infecția pneumococică.

Şoarecele este animalul cel mai sensibil, infectarea cu 1—5 pneumococi foarte virulenţi provocînd o septicemie mortală în 24—48 de ore. Pneumococi încapsulaţi sînt prezenţi în sîngele şi organele (splina, ficat) animalelor moarte.

Pneumonia experimentală a fost obţinută la maimuţe şi cîini prin introducerea germenilor în trahee sau bronhii, după narcoză. Atelectazia lobului infectat, iritaţia mucoaselor prin anestezic, acumularea de secreţii în bronhii, constituie factori favorizanţi pentru apariţia bolii.

Imunitate. Imunitatea naturală a diferitelor specii animale variază de la sensibilitatea marcată a omului, şoarecelui şi iepurelui, la rezistenţa relativă a cobailor, cîinilor, şobolanilor şi pisicilor, pînă la rezistenţa accentuată a păsărilor.

Imunitatea dobîndită prin boală, prin starea de purtător în rinofaringe a diferitelor serotipuri de pneumococi, sau prin vaccinare, este specifică de tip şi ţine de prezenţa anticorpilor anti-SSS.

Gradul de rezistenţă dobîndită este în raport cu antigenicitatea (cantitatea de polizaharid specific secretată de tipul infectant), durata şi gravitatea infecţiei şi administrarea precoce sau tardivă a tratamentului specific. Ea se traduce prin prezenţa în sînge a aglutininelor, precipitinelor şi bacteriotropinelor specifice, care favorizează fagocitoza.

Tratamentul specific. Înainte de seroterapie, decesele la 100 de cazuri de pneumonie erau în jurul a 30. După introducerea sulfamidelor au scăzut la 10%, iar apoi la 5% după adăugarea penicilinei în terapeutica acestor infecţii.

Seroterapia a constituit o metodă preţioasă în tratamentul pneumoniei. Ea s-a bazat pe cercetările lui Dochez şi Avery care au dovedit rolul imunităţii cu specificitate de tip în această infecţie. După primele seruri terapeutice obţinute pe cai, cu pneumococi tip I şi al II-lea, s-au preparat seruri purificate cu numeroase alte tipuri implicate în etiologia bolii. Serurile preparate pe iepure au dat rezultatele cele mai bune. Succesul metodei ţine de aplicarea precoce a serului în injecţii repetate, pe cale intravenoasă, care să asigure prezenţa în exces a cantităţilor de anticorpi necesare neutralizării polizaharidului pneumococic pus în libertate în organism.

Chimioterapia. Pneumococii sînt foarte sensibili la majoritatea sulfamidelor şi antibioticelor. Rezistenţa la sulfamide poate apărea în cazurile tratate cu doze mici timp îndelungat. Sulfamidele, care exercită o acţiune bacteriostatică, reduc multiplicarea germenilor, vindecarea fiind asigurată de apariţia anticorpilor specifici. De aceea se admite că seroterapia ar putea exercita un efect sinergic cu sulfamidele.

În cazul penicilinei, care manifestă un efect bactericid, prezenţa anticorpilor specifice ocupă un loc mai puţin însemnat în lichidarea procesului infecţios (McLeod).

Vaccinoterapia şi autovaccinoterapia pot fi asociate tratamentului, mai ales în cazurile de apariţie a rezistenţei la sulfamide sau antibiotice.

Diagnosticul de laborator

Diagnosticul de laborator are ca obiectiv cercetarea prezenţei germenului în produsele patologice şi comportă: 1. Examenul direct; 2. Izolarea; 3. Identificarea pneumococului.

Două metode—a) fenomenul lui Neufeld, de umflare a capsulei şi b) inocularea la şoarece—oferă posibilitatea unei identificări a serotipului de pneumococ, într-un timp mult mai scurt decît izolarea germenului pe mediile de cultură, urmată de identificarea lui prin metodele biochimice şi serologice. Aceste două metode vor fi preferate pentru cercetarea tuturor produselor de examinat cînd există posibilităţi de a fi executate.

1. **Examenul direct** : a) se notează dacă produsul patologic prezintă aspectele caracteristice (spută ruginie, coloraţia verde a puroiului de consistenţă cremoasă, fibrinoasă).

b) În frotiurile colorate cu metoda Gram şi albastru de metilen, pneumococii se prezintă sub formă de coci alungiţi, lanceolaţi, dispuşi în diplo sau în lanţuri scurte, înconjuraţi de capsulă, coloraţi gram-pozitiv.

Dacă sputa conţine numeroşi pneumococi, se procedează la identificarea imediată a tipului prin reacţia de umflare a capsulei (Neufeld, 1900).

Pentru aceasta, un mic fragment de spută se emulsionează în cîţiva mililitri de ser fiziologic, fie prin amestecare într-o seringă sterilă, fie într-un balon cu perle sau în mojar steril.

Tehnica reacţiei Neufeld, de umflare a capsulei. Pe o lamă curată se depun cu ajutorul unei anse fine : o picătură din spută, o picătură ser imun specific şi o picătură soluţie albastru de metilen. Se amestecă cu ansa şi se acoperă cu o lamelă. Reacţia se practică separat cu fiecare din serurile specifice de tip, pe care le avem la dispoziţie (de exemplu, serurile tip I, II, III), aşezînd pe o lamă cîte două preparate. În acelaşi mod se pregăteşte şi martorul, constituit din spută amestecată cu ser fiziologic, în loc de ser imun. Se examinează la microscop cu imersie. Dacă pneumococul din spută aparţine unuia din tipurile serurilor adăugate, se produce în prezenţa serului corezpunzător, umflarea capsulei. În acest caz, germenii sînt aglutinaţi şi capsulele apar mult mărite de volum, cu marginea bine delimitată. În celelalte preparate, ca şi la martor, capsulele apar de dimensiuni reduse şi germenii nu sînt aglutinaţi. Reacţia este evidentă în primele 10 minute de la amestec. Un rezultat negativ arată că pneumococii nu aparţin tipurilor corespunzătoare serurilor utilizate.

În acest caz, ca şi atunci cînd germeni se găsesc în spută în număr redus, se trece mai departe la izolarea şi identificarea germenului.

2. **Izolarea pneumococului din produsele patologice.** Metoda cea mai rapidă de izolare a pneumococilor constă în inocularea la şoarece.

Tehnica inoculării: o cantitate de 0,5 ml din diluţia de spută (sau alt produs), emulsionată în ser fiziologic, se inoculează subcutan sau intraperitoneal la şoareci albi, în greutate de 16—20 g. În cazul cînd produsul conţine pneumococi virulenţi, animalul sucombă în 24 de ore. Se practică autopsia animalului, la care se fac următoarele examene : hemocultura din cord, cercetarea pneumococilor în lichidul peritoneal pe frotiuri colorate prin metoda Gram şi albastru de metilen şi frotiuri prin impresiune din organe (splină, ficat) colorate prin aceleaşi metode.

Dacă se constată pe frotiuri prezenţa pneumococilor în secreţia peritoneală şi în organe se trece imediat la determinarea tipului prin metoda umflării capsulei. Secreţia peritoneală, recoltată cu pipeta Pasteur, este bine să fie diluată cu ser fiziologic, deoarece un număr prea mare de germeni care duce la formarea de grunji masivi în prezenţa serului specific, îngreuiază observarea umflării capsulei. Însămînțările făcute din inima șoarecelui pe placă cu geloză-sînge și bulion, se examinează după 24 de ore incubație la 37°. În cazul unui rezultat pozitiv, tubul cu bulion este tulburat uniform și în frotiul colorat prin metoda Gram se constată prezența pneumococilor. Pe placa cu sînge, coloniile sînt înconjurate de o zonă de 2—3 mm de hemoliză.

Însămînțarea produselor patologice. Paralel cu inocularea la șoarece sau în lipsa posibilității de a practica această probă, pneumococul poate fi pus în evidență prin însămînțări pe medii de cultură. Pentru izolarea germenului se folosesc placa cu geloză sînge și un mediu lichid. Mediul lichid preferat este bulionul T (Truche) cu următoarea compoziție: 1000 ml apă distilată, 40 g peptonă Chapoteaut, 5 g NaCl, 2 g glucoză, pH final = 7,8. După dizolvarea peptonei în apă, se adaugă NaCl și se ajustează pH. Se autoclavează timp de 30 de minute la 120°. Filtrare și sterilizare finală. Se adaugă glucoza, sterilizată separat la 110°.

În lipsa peptonei Chapoteaut se poate utiliza orice altă peptonă de bună calitate sau mediul preparat după formula Tiem.

Pentru păstrarea culturilor se utilizează mediul T-gelatină care este constituit din mediul T lichid conținînd gelatină în cantitate de 200 g la 1000 ml bulion.

Bulionul sînge este un bun mediu pentru întreținerea culturilor. Pentru conservarea îndelungată a germenilor, cu calitățile biologice nemodificate, se recurge la liofilizarea culturilor sau păstrarea la — 70° a șoarecilor morți, după infectare cu tulpina de pneumococ.

Tehnica însămînțării. Sputa și puroiul cremos se diluează în prealabil cu ser fiziologic. Cîteva picături se depun pe o placă cu geloză-sînge și se diseminează în striuri, cu ansa. După incubație la 37°, se examinează aspectul culturilor și se practică frotiuri colorate prin metoda Gram. Coloniile caracteristice se trec în medii lichide, care vor permite identificarea culturii.

3. Identificarea pneumococilor izolați în cultură pură se face prin una din următoarele reacții: a) testul cu optochin; b) proba bilolizei; c) fermentarea inulinei; d) aglutinarea în prezența serurilor specifice de tip; e) umflarea capsulei și f) patogenitatea la șoarece.

a) *Testul cu optochin.* Sensibilitatea pneumococilor la optochin constituie o probă care îl diferențiază de ceilalți germeni (*Str. viridans*, hemolitic, stafilococ).

Testul se practică însămînțînd pe o placă cu geloză-sînge tulpina respectivă și depunînd în mijlocul ariei însămînțate preparatul de optochin, fie ca soluție 0,05%, fie încorporat în amidon (0,005 g la 1 g amidon). Pneumococul prezintă de obicei o zonă de inhibiție care depășește 25 mm în diametru (Beloiu, Pleciaș).

b) *Biloliza.* Capacitatea pneumococilor de a fi lizați de bilă îi deosebește de streptococi.

Tehnica reacției de biloliză. Reacția se poate practica cu cultura în bulion ca atare sau mai bine cu sedimentul centrifugat al culturii în bulion, reluat în ser fiziologic. Se repartizează în 2 tuburi cîte

1 ml cultură. La unul din tuburi se adaugă fie 1 ml bilă sterilă de bou, fie soluție 10 % de taurocolat de sodiu sau soluție 10 % de dezoxicolat de sodiu. În celălalt tub, care servește drept martor, se adaugă 1 ml ser fiziologic. Poate fi inclus și un al doilea martor, constituit din cultura încălzită timp de 30 de minute la 65°. Reacția pozitivă se manifestă prin clarificarea culturii în tubul la care s-a adăugat bila sau sărurile biliare, prin comparație cu martorul cu ser fiziologic și cu cultura omorîtă, care rămîn tulburi. Dacă reacția nu apare în cîteva minute la temperatura laboratorului, tuburile se mențin la termostat timp de 30 de minute, după care se face lectura finală.

c) *Fermentarea inulinei* se face însămînțînd cultura în mediul Hiss cu inulină. Coagularea mediului și virarea indicatorului arată o reacție pozitivă.

d) *Reacția de aglutinare.* Se utilizează depozitul centrifugat al culturii în bulion, suspendat în ser fiziologic. Serurile aglutinante se diluează în progresie geometrică pînă la limita titrului. La fiecare diluție din serurile aparținînd diferitelor tipuri se adaugă cîteva picături de emulsie microbiană. Martorul cu ser fiziologic este obligatoriu. Citirea se face după incubația de 2 ore la 37°.

e) *Tehnica umflării capsulei* a fost descrisă mai sus. De data aceasta, se practică cu diluții de ser pentru a aprecia titrul capsular. Cultura se diluează astfel ca să conțină 10—20 de coci pe cîmp.

Inocularea la șoarece permite aprecierea gradului de virulență. Animalele se observă timp de 5 zile. După moarte, se practică autopsia pentru a constata prezența pneumococului.

Epidemiologie. Izbucniri epidemice de pneumonie au fost semnalate în unele țări și mai ales în spitalele de boli mintale, cazărmi, colonii școlare, în care supraaglomerarea, eforturile fizice, condițiile igienice rele, constituiau factori favorizanți.

Apariția cazurilor este condiționată de epidemii premergătoare de afecțiuni virotice (răceală comună, gripă) și de prezența și răspîndirea în comunitatea respectivă a purtătorilor de pneumococi virulenți de anumite tipuri. În timpul epidemiei, tipul epidemic de pneumococ se întîlnește la un număr mare de purtători sănătoși. Răspîndirea germenilor se face pe cale aeriană, purtătorii sănătoși fiind mai periculoși decît bolnavii care, o dată diagnosticul stabilit, sînt izolați.

Tipurile de pneumococi cauzatoare de epidemii sînt aceleași ca în pneumonia sporadică (I, II, IV, V, VII).

Profilaxia. Vaccinarea preventivă antipneumococică cu vaccinuri preparate cu germeni omorîți a dat rezultate încurajatoare. Rezultate foarte promițătoare au fost obținute prin vaccinarea pe cale subcutană cu polizaharizi specifici. Experiența lui McLeod, Hodges și Heidelberger oferă un exemplu asupra eficienței acestei metode de vaccinare. Autorii au vaccinat cu polizaharizi tip I, II, V, VII, administrați în cantitate de 0,06 mg pentru fiecare tip, pe cale subcutană, la jumătate din efectivul unei armate în care timp de 2 ani evolua o epidemie de pneumonii cu tipurile I, II, IV, V, VII şi XII. După 2 săptămîni de la vaccinare cazurile de boală cu tipurile de pneumococi utilizate la vaccinare au dispărut printre cei vaccinaţi şi s-au redus simţitor în grupul nevaccinat. Cazuri de boală cu tipurile de pneumococi care nu au intrat în compoziţia vaccinului (IV, XII) s-au semnalat în continuare la întreg efectivul. Durata imunităţii este de aproximativ 6 luni.

Cum afecţiunile virotice ale căilor respiratorii superioare constituie o cauză principală a apariţiei pneumoniei sporadice sau epidemice, se presupune că vaccinarea preventivă contra acestor afecţiuni (gripă) va putea avea ca rezultat şi reducerea morbidităţii prin pneumonie.

Genul leuconostoc

Dr. Coralia Baldovin-Agapi

Familia : *Lactobacillaceae.* Tribul : *Streptococceae.* Genul : *Leuconostoc.* Specia tip : *Leuconostoc mesenteroides.*

Germenii din genul *Leuconostoc* sînt înrudiţi cu streptococii, atît prin caracterele lor morfologice, cît şi prin faptul că unele specii de streptococi posedă, în comun cu ei, capacitatea de a elabora pe mediile cu zaharoză, hexoze polimerizate de tip dextran-levan.

Istoric. Încă din 1861, Pasteur a bănuit originea microbiană a fermentaţiei gelatinoase a sucurilor vegetale bogate în substanţe zaharate. Descrierea germenilor, sub formă de coci în perechi şi lanţuri scurte, care formează în mediile cu zahăr o masă zoogleică vîscoasă, se datoreşte lui Cienkowski (1878), care i-a denumit *Ascococcus mesenteroides.* Denumirea de *Leuconostoc* a fost dată de van Tieghem (1878) care a încercat clasificarea lor. Zahărul format de aceşti germeni a fost identificat de Schiebler (1874) ca o polianhidridă de glucoză, cu capacitate dextrorotatorie.

Habitat. Se întîlnesc pe rădăcinile de sfeclă şi păstîrnac, pe care se dezvoltă sub formă de mase groase de consistenţă gelatinoasă, cartilaginoasă. De asemenea, în sucurile vegetale în curs de fermentare : sfeclă de zahăr, trestie de zahăr, pe care le transformă într-o masă vîscoasă. Unele specii trăiesc în lapte.

Caractere morfologice. Se prezintă sub formă de coci rotunzi sau ovoizi de 0,9—1,2 μ, dispuşi în diplo sau lanţuri scurte. Reţin coloraţia Gram, cu tendinţa de a se decolora uşor. În mediile cu zaharoză, apar ca mase zoogleice, cocii fiind înecaţi în masa gelatinoasă de zahăr polimerizat.

Caractere de cultură. Nu se dezvoltă pe medii simple (bulion sau agar). În culturile dezvoltate în apă peptonată sau gelatină cu maltoză sau lactoză, se aseamănă morfologic cu streptococii. Dacă la gelatină se încorporează glucoză sau zahăr de trestie, cultura ia aspectul de masă sticloasă, cartilaginoasă, confluentă, care mai tîrziu devine vîscoasă. Mediile lichide sînt transformate într-o masă gelatinoasă formată din dextran.

Caractere biochimice și de metabolism. Caracterul distinctiv al germenilor din genul *Leuconostoc* este constituit de capacitatea de a forma dextran în mediile conținînd zaharoză, datorită unei enzime—dextransucraza care poate fi separată de corpii microbieni.

Spre deosebire de celelalte genuri ale tribului *Streptococceae*, leuconostocii sînt etero-fermentativi, scindînd zaharurile cu producere de cantități însemnate de CO_2 și produse volatile. Fermentează glucoza, maltoza, sucroza, manitolul, arabinoza sau xiloza.

Aerobi și facultativ anaerobi. Temperatura optimă de dezvoltare și de producere a dextranului este de 25°. Nu posedă catalază și oxidază. Reacția Voges-Proskauer este negativă. Reduc albastrul de metilen; nu reduc nitrații și nu utilizează sărurile acizilor organici ca sursă de carbon.

Clasificare. Hucker și Pederson (1930) au diferențiat 3 specii care se disting în privința fermentării pentozelor și a formării de dextran din zaharoză.

Leuconostoc mesenteroides fermentează pentozele și produce dextran.

Leuconostoc dextranicus nu fermentează pentozele și produce dextran în cantități moderate.

Leuconostoc citrovorum nu fermentează pentozele și nu produce dextran.

Ultima specie se găsește în lapte.

McCleskey (1947) distinge în tulpinile de *Leuconostoc mesenteroides* din sfeclă, 4 feluri de colonii (A, B, D, F), care se deosebesc din punct de vedere morfologic. Tulpinile coloniei D sînt cele mai activ producătoare de dextran.

Dextranii elaborați de leuconostoci, ca și de *Str. sanguis*, grup H Lancefield, sau de *Str. bovis* precipită în prezența serurilor preparate cu germenii respectivi cultivați în medii cu zaharoză, cît și în prezența serurilor antipneumococice tipul al II-lea. Această proprietate servește ca mijloc de identificare serologică a dextranilor formați de acești germeni.

Preparatele de dextran, obținute cu ajutorul tulpinilor de *leuconostoc* sînt utilizate ca substituenți macromoleculari de volum ai plasmei la om.

Genul Neisseria

Prof. L. Boer

Denumirea *Neisseria* provine de la numele lui Neisser care a descoperit agentul cauzal al gonoreei în anul 1879.

Speciile patogene pentru om cuprinse în acest gen sînt : *Neisseria meningitidis* (meningococul), agentul cauzal al meningitei cerebro-spinale epidemice şi *Neisseria gonorrhoeae* (gonococul), agentul etiologic al gonoreei.

Alte specii ca *N. catarrhalis*, *N. sicca*, *N. flava*, *N. flavescens* etc. se găsesc în nazo-faringele oamenilor sănătoşi şi pot uneori fi întîlnite în meningite, bronhopneumonii etc., sau să producă infecţii vaginale la fetiţe care se pot confunda cu infecţiile gonoreice. Cercetările recente au demonstrat că toate speciile din genul *Neisseria*, cu excepţia meningococului, se găsesc şi în secreţiile uretrale la bărbaţi.

Caracterele generale ale genului *Neisseria*. Din punctul de vedere morfologic şi al afinităţii tinctoriale, speciile din genul *Neisseria* sînt diplococi gram-negativi, în formă de boabe de cafea, variind totuşi ca morfologie şi grupare, atît cu specia de *Neisseria*, cît şi cu condiţiile de mediu.

Toţi membrii grupului sînt aerobi ; optimum de temperatură este 37°. *N. meningitidis* şi *N. gonorrhoeae* nu cresc sub 30° pe cînd celelalte specii pot creşte şi la 22°, dar nu totdeauna la prima izolare.

Unele specii de *Neisseria* cresc pe mediile obişnuite de cultură ; *N. gonorrhoeae* şi *N. meningitidis* au nevoie însă de medii selective de cultură, care conţin lichide organice ca : sînge, lichid de ascită, ser etc.

Rezistenţa la agenţii fizici şi chimici a germenilor din grupul *Neisseria* este slabă, iar structura lor antigenică este instabilă ; la multe chiar necunoscută.

Neisseria meningitidis şi infecţiile meningococice

Sinonime : *Diplococcus intracellularis meningitidis*, *Neisseria weichselbaumi*, *Micrococcus intracellularis*, *Meningococcus*.

Istoric. Studiul infecţiei a fost posibil numai după descoperirea agentului cauzal. *Neisseria meningitidis* a fost observat în anul 1887 de către Weichselbaum, care l-a pus în evidenţă în lichidul cefalorahidian al unor bolnavi cu meningită cerebro-spinală.

Identificarea germenului şi clarificarea rolului său ca agent al meningitei cerebro-spinale epidemice au fost realizate de către cercetătorii Councilman, Mallory şi Wright (1898).

Sindromul meningian este cunoscut din antichitate, însă prima apariţie epidemică a meningitei a fost descrisă de Vieussenx la Geneva, în anul 1805.

Habitat. Se găseşte în nazo-faringele omului. În condiţii naturale nu se găseşte la animale.

De la omul bolnav se pune în evidenţă din: nazo-faringe, conjunctive, sînge, erupţii cutanate peteşiale, exsudatul articular, suprafaţa şi cavitatea meningiană (lichidul cefalorahidian), pleură, endocard etc.

Caractere morfologice şi de colorabilitate. Coci ovalari sau sferici ($0,6\mu - 1\mu$) necapsulaţi; unele tulpini prezintă capsulă la izolare; sînt dispuşi în diplo, cu aspect de boabă de cafea; uneori, izolaţi unul cîte unul, alteori în tetrade.

În lichidul cefalorahidian, în rino-faringe sau produsele patologice prezintă morfologia şi dispoziţia caracteristică, majoritatea fiind intracelulari, înglobaţi în polinucleare.

În culturi, datorită autolizei, se constată un polimorfism accentuat; pentru unele tulpini, acest polimorfism începe chiar de la 1—6 ore; după 24 de ore se observă coci sferici, turtiţi, izolaţi, giganţi, inegali ca mărime şi colorabilitate.

Se colorează uşor cu coloranţii obişnuiţi. Este gram-negativ. Pentru coloraţia frotiurilor provenite din produse patologice, care conţin şi elemente celulare, Dumas şi colaboratorii recomandă coloraţia Pick şi Iacobson, prin care nucleii celulari ai *N. meningitidis* se colorează în albastru, iar protoplasma celulelor, în roz.

Caracterele de cultură. *N. meningitidis* nu se dezvoltă pe mediile obişnuite de cultură; germenul cere prezenţa de lichide organice provenite de la mamifere.

În medii lichide: bulion-ser, bulion-ascită, bulion-sînge, ser de iepure inactivat (30 de minute la 60°), meningococul se dezvoltă sărac, tulburînd uşor mediul cu depozit mic; către a 3-a zi se constată apariţia unui văl fin.

Pe medii solide: geloză-ascită, geloză-ser sau geloză-sînge se dezvoltă după 24 de ore, colonii de tip „S", rotunde, de circa 1 mm diametru, convexe, cu margini regulate, translucide, sclipitoare, albe-cenuşii, uşor suspensionabile. În culturi de 48 de ore, coloniile au 2—3 mm diametru; în culturi de 7 zile, coloniile devin gălbui, opace, cu margini neregulate şi suprafaţa granulară.

Din formele „S" se pot dezvolta forme „R" opace, cu margini neregulate. La purtătorii sănătoşi se izolează de obicei forme „R".

Tulpinile recent izolate trebuie subcultivate frecvent, pentru a le adapta la condiţiile mediilor artificiale. Tulpinile vechi, adaptate, se menţin în viaţă chiar pe medii simple (de exemplu geloză). În geloză semilichidă, meningococii şi alte *Neisserii* trăiesc mai multe săptămîni.

Caractere biochimice şi de metabolism. *N. meningitidis* este aerob şi facultativ anaerob. Se dezvoltă după o perioadă prelungită, între 30°

şi 40° cu un optim de 37°, la pH 7,0 – 7,2. Atmosfera de CO_2, în concentraţie 5 – 10 %, favorizează cultura; CO_2 are rol în metabolism inhibînd totodată şi alcalinizarea mediului.

La izolarea din organism se dezvoltă bine pe medii care conţin unii aminoacizi: alanina, acidul aspartic etc; alţii, ca asparagina, cistina, glicina, tirozina, inhibează dezvoltarea meningococului. *N. meningitidis* are nevoie şi de substanţe asemănătoare vitaminelor, prezente în sînge, ascită, ser, extract globular. Agarul moale favorizează multiplicarea.

Alte medii utilizate pentru cultivarea meningococului sînt: agar şocolat preparat cu sînge de iepure, mediile cu hidrolizat de cazeină cu amidon. În U. R. S. S., mediul larg folosit este mediul Levinthal.

Fermentează, fără producere de gaze, glucoza şi maltoza; nu coagulează laptele; produce catalază; toate speciile din genul *Neisseria* dau reacţia oxidazei descrisă de Gordon şi McLeod. Reduce albastrul de metilen. Uneori se observă că, cu toată întreţinerea în condiţii optime de cultivare, culturile de *Neisseria meningitidis* mor de pe o zi pe alta, probabil prin acţiunea alcalinităţii şi autolizinelor.

Rezistenţa la agenţii fizici, chimici şi biologici. Meningococul moare sub 24° şi peste 40°. La temperatura de 55° este distrus în 5 minute. Uscăciunea şi lumina îl distrug în 3 ore.

Menţinut în lichidul cefalorahidian la temperatura laboratorului, meningococul moare rapid; de aici utilitatea însămînţării lichidului cefalorahidian, imediat după puncţie.

În mucozităţile faringiene, în afara organismului, poate supravieţui 2 – 3 zile.

În culturi, la temperatura laboratorului, moare în 3 ore. Moartea se datoreşte acţiunii fermentului autolitic şi alcalinizării active a mediului sub influenţa metabolismului bacterian (de aici acţiunea favorizantă prin acidifierea cu CO_2).

Cea mai bună metodă de păstrare a meningococilor în faza „S" virulentă, este liofilizarea germenului, imediat după izolare.

Foarte sensibil la acţiunea antisepticelor: sublimatul 1‰ îl omoară instantaneu; fenolul 1 % într-un minut; este omorît de vaporii de iod, eucaliptol, gomenol, eter etc.

Este sensibil la penicilină, streptomicină şi sulfamide.

Structura antigenică. A fost studiată de mulţi cercetători.

Dopter (1909) menţionează prezenţa în mucusul nazo-faringian a unor coci asemănători ca morfologie, caractere de cultură, metabolism cu *Neisseria meningitidis* şi care nu erau aglutinaţi de serurile antimeningococice. El a denumit aceşti coci: *parameningococi*, astăzi, denumiţi *aberanţi* sau *atipici*.

În urma cercetărilor făcute în timpul epidemiilor de meningită, apărute între anii 1914 şi 1919, sînt de reţinut clasificările lui Nicolle şi colaboratorii care diferenţiază meningococii în 4 tipuri: A,B,C,D, şi ale lui Gordon şi Murray în tipurile I, II, III, IV.

Lucrările din timpul epidemiilor din S.U.A. (1927-1930), efectuate de către Wodsworth şi Branchman, au arătat, pe de o parte, strînse înrudiri antigenice între tipurile I şi III, tipuri serologice predominante în epidemii, iar pe de altă parte, înrudirea tipului II cu tipul IV, care au fost izolate în cazurile sporadice din perioadele interepidemice (tip endemic).

Este de menționat că, în perioadele epidemice, se pot izola tulpini atipice într-o proporție de 30%.

Cercetările recente, bazate pe reacții de aglutinare și adsorbții de aglutinine, au permis diferențierea meningococilor în două grupe principale : grupul I și II (Griffith). Unii cercetători divid grupul I în tipurile I și III și grupul II în tipurile II și IV, care corespund cu tipurile descrise de Gordon și Murray.

Meningococii de grup I (A) după clasificarea lui Nicolle și colaboratorii au fost întîlniți în toate valurile de infecții epidemice, ei reprezentînd grupul epidemic.

Cazurile sporadice de infecții meningococice, din anii neepidemici, sînt obișnuit datorite grupului II (B + C + D). După clasificația lui Nicolle și colaboratorii, majoritatea purtătorilor cronici posedă meningococi de grup II (B + C + D).

Infecțiile datorite grupului II dau forme septicemice ușoare cu simptome meningiene nu prea grave și localizări în organe : de exemplu, endocard.

Grupul II (B + C + D) nu este omogen serologic.

În tabelul XVI sînt sintetizate cele mai cunoscute clasificări serologice ale *N. meningitidis*.

Tabelul XVI

Cîteva clasificări serologice ale ***Neisseria meningitidis***

Dopter și Pauron	Gordon și Murray	Griffith și Scott	Nicolle, Dobains și Juan	Evans (grupuri tropinice)	Uzul comun	Recomandat de Comitetul internațional pentru nomenclatura bacteriilor, Subcomitetul *Neisseria*
1914	1915	1916	1918	1920	1940	1950
Meningococcus	I					
	III	I	A	R	I	A
Parameningococcus	II	II	B	S	II	B
	IV			Z	IV	D
			C		II	C
			D		α	

Cercetările de *imunochimie* arată că meningococul conține :

1. O substanță polizaharidică (substanța „C"), specifică de gen și specie, care precipită, atît în prezența serului polivalent meningococic, cît și în prezența serului antigonococic și a serului antipneumococic, tip III.

2. O *fracțiune nucleoproteinică* (substanța „P") comună întregului gen *Neisseria*, care reacționează cu serul antigonococic și antipneumococic tip III ; este toxică pentru iepuri și șoareci.

3. O sare de sodiu a unui *polizaharid acid* (substanța „SI"), situată mai mult la suprafața celulei, specifică pentru tipul I și III, în care se pune în evidență N și P.

4. Ulterior s-a mai descris, la unele tulpini capsulate, și un *înveliș polizaharidic specific*. M. Ciucă, E. Soru și V. Manolescu au pus în evidență în structura meningococului un antigen glucido-lipidic, cu caractere

specifice de tip, în compoziţia căruia intră fracţiunile polizaharidice indicate mai sus.

Reacţiile de grup şi de tip se pun în evidenţă prin umflarea capsulei prin teste de precipitare (mai specific), prin aglutinări cu antiseruri specifice.

Cultivarea unei tulpini de meningococ pe geloză + ser imun corespunzător produce precipitarea în jurul coloniilor, a antigenului chimic specific sub formă de inele. O reacţie pozitivă indică virulenţa şi antigenitatea tulpinii cercetate.

În ultima vreme, Soru şi Topciu (1960) au pus în evidenţă un compus atoxic antigenic, care determină formarea unui anticorp precipitant cu specificitate de tip pentru antigenul izolat din tipul A şi de grup pentru antigenele izolate din tipurile B şi C.

Caractere de patogenitate a agentului cauzal (virulenţa, toxigeneza). Virulenţa germenilor aparţinînd speciei *Neisseria meningitidis* este strîns legată de structura antigenică. Am văzut că tipurile I şi al III-lea (grupa I sau A) provoacă cele mai grave îmbolnăviri la om.

Variantele capsulate sînt mai virulente decît cele necapsulate.

Nu a fost pusă în evidenţă elaborarea de exotoxină.

Endotoxina se prepară prin autoclavare, congelare-decongelare, uscare, sau prin tratamentul chimic al corpilor microbieni (acid tricloracetic, fenol etc.).

Cantităţi mici de endotoxină inoculate intraperitoneal la cobai şi şoarece alb provoacă o peritonită sero-hemoragică sau purulentă; animalele sucombă în 24-48 de ore.

Boala la om. Meningita este precedată de rinofaringită, cu coriză specifică datorită *N. meningitidis*, care se găseşte în nazo-faringe în toată perioada acută a meningitei şi dispărînd după convalescenţă.

Meningococul poate exista în cavitatea nazo-faringiană, fără să producă leziuni locale şi complicaţii meningiene.

Infecţia meningococică urmează calea limfatică sau sanguină provocînd meningococemii (43 — 50%), urmate uneori de meningita purulentă. În unele cazuri infecţia meningococică se asociază cu un colaps circulator, care indică o infecţie severă; în septicemii grave apare şi sindromul hemoragic.

Leziunile provocate de *N. meningitidis* constau în reacţii congestive, exsudate sero-fibrinoase şi fagocitoză foarte activă (exsudate purulente).

Meningococemiile pot determina localizări cutanate (erupţii), articulare, pleurale, endocardice, caracterizate prin leziunile anatomopatologice mai sus enumerate.

Meningita cerebro-spinală epidemică debutează după 2—4 zile de incubaţie cu febră, adeseori frisoane, cu cefalee puternică, vărsături şi uneori cu delir. În primele zile apar o serie de simptome caracteristice meningitei cerebro-spinale, ca: redoarea cefei, semnele Kernig şi Brudzinski, leziuni cutanate; se observă o creştere a sensibilităţii generale (hiperestezie), dureri la apăsare de-a lungul coloanei vertebrale şi la nivelul cutiei craniene, paralizii ale muşchilor oculari, leziuni ale nervului auditiv şi altele.

Simptomatologia schematică de mai sus apare deseori numai parţial (forme atipice).

N. meningitidis nu este spontan patogen pentru animale.

Infecția experimentală. Majoritatea tulpinilor de meningococ recent izolate, inoculate parenteral, omoară *șoarecele* prin intoxicație cu endotoxină.

Inocularea intraperitoneală la șoareci, în geloză semilichidă, în suspensii cu gălbenuș de ou sau mucină (în concentrație de 2—5%), provoacă o peritonită purulentă, urmată de *septicemie* și moartea animalului.

Cobaiul inoculat intraperitoneal cu o suspensie densă, moare în 24 de ore cu peritonită și toxemie. Agentul patogen nu se găsește în sînge.

Iepurele. Zdrodovski a reușit să inoculeze *N. meningitidis* pe cale suboccipitală. Animalele au sucombat în 3—7 zile, cu fenomene meningiene. La autopsie s-au găsit leziuni meningiene, lichid cefalorahidian purulent sau clar, în care s-au pus în evidență polinucleare; în 47 de cazuri din 50 s-a identificat *Neisseria meningitidis*.

Maimuța este cel mai sensibil animal față de infecția experimentală (Flexner). O cantitate convenabilă din agentul patogen, injectată în cavitatea meningiană a maimuței, produce o meningită purulentă acută și moartea animalului în 24 de ore. Cantități mai mici provoacă meningite cronice care au ca urmare slăbirea și moartea animalelor în 3—4 săptămîni.

Imunitate. Toate animalele de laborator prezintă o imunitate de specie față de infecția naturală.

Imunitatea dobîndită, după infecție, este pusă în evidență prin apariția aglutininelor precipitinelor, bacteriolizinelor.

În infecția umană, aglutininele apar în sîngele bolnavilor după 5—15 zile, în titru de 1/80—1/360 și persistă 3—4 luni.

Anticorpii fixatori de complement apar în timpul convalescenței și nu pot folosi la diagnostic, deoarece apariția lor este tardivă.

Tratament specific. Meningita cerebro-spinală epidemică și infecțiile altor organe produse de *N. meningitidis* se bucură de un tratament specific, realizabil cu ajutorul seroterapiei și al chimioterapiei, uneori combinate între ele.

Administrarea de sulfamide (sulfatiazol și mai ales sulfametoxipiridazina cea mai puțin toxică) este astăzi folosită cu cel mai mare succes; mortalitatea a fost redusă la minimum.

Penicilina este la fel de eficace în eliminarea germenilor din sînge. În cazurile foarte grave, cînd meningococii au devenit rezistenți la sulfamide și penicilină, este indicată seroterapia.

Serul antimeningococic provine de la caii imunizați prin inoculare cu culturi vii. Fiecare animal este vaccinat cu un singur grup de meningococi; serul dat spre întrebuințare este un amestec de seruri monovalente (ser polivalent).

Necesitatea determinării tipului germenului izolat pentru o terapie specifică cu ser monovalent, precum și utilitatea introducerii de tulpini atipice (aberante), locale, în imunizarea cailor producători de ser, este evidentă.

Serul antimeningococic se administrează pe cale intrarahidiană, în cantitate de 15—20 ml pentru copii sub un an și 20—45 ml pentru adulți. Injecția se face numai după extragerea unei cantități de lichid cefalorahidian, cel puțin egală cu cantitatea de ser terapeutic care urmează să fie injectată. Administrarea serului terapeutic se face sub controlul microscopic, zilnic, timp de 3—4 zile, pînă la clarificarea lichidului cefalorahidian, dispariția germenilor și apariția în lichid a mononuclearelor. În caz de apariție a meningitei serice se opresc injecțiile intrarahidiene de ser terapeutic.

În meningococemii, inoculările intravenoase și intramusculare completează obligatoriu, acest mod de tratament.

Diagnosticul de laborator

Recoltarea produselor patologice. Lichidul cefalorahidian se recoltează cu precauțiile de sterilitate cerute.

Recoltarea sîngelui în vederea practicării hemoculturii se face de preferință în primele 8 zile de boală, prin puncție venoasă.

Exsudatul rino-faringian este obținut cu ajutorul tampoanelor sterile; recoltarea se face în așa fel ca tamponul să nu vină în contact cu saliva, acest produs fiind nociv pentru *N. meningitidis*.

Post-mortem, lichidul cefalorahidian se obține din ventricule și de la baza creierului, după deschiderea cutiei craniene. Se mai efectuează frotiuri și însămînțări din inimă, splină, ficat. Prelevarea se efectuează cu toate precauțiile de sterilitate.

Metode bacteriologice. În meningita cerebro-spinală epidemică, diagnosticul se bazează pe punerea în evidență a meningococului în produsele patologice, iar la purtători, din exsudatele rino-faringiene.

Examenul lichidului cefalorahidian. Se notează aspectul exterior: gradul de opacitate, culoarea, prezența sau absența sîngelui, prezența sau absența fibrinei.

Se cercetează în preparat proaspăt, numărul și calitatea elementelor celulare. Lichidul cefalorahidian conținînd elemente puține, este centrifugat și din sediment se fac frotiuri, care se colorează cu albastru de metilen și metoda Gram. Cînd pe frotiuri nu se văd germeni microbieni, ci polinucleare vacuolate, se examinează mai multe preparate.

Examenul bacteriologic și citologic al lichidului cefalorahidian trebuie efectuat imediat după puncție, ținînd seamă că meningococul are o rezistență mică în afara organismului. Însămînțarea lichidului cefalorahidian în vederea examenului bacteriologic se efectuează pe mediile selective, încălzite în prealabil la 37°, chiar în momentul puncției.

Hemocultura. Se însămînțează sîngele recoltat steril în bulion-ser, sau bulion-ascită, în proporție de 10/200. La indivizii tratați cu penicilină se adaugă mediului de cultură penicilinază (1—2 ml filtrat de cultură de *Esch. coli* în vîrstă de 6—7 zile în bulion), spre a anihila acțiunea inhibitoare a penicilinei. La cei tratați cu sulfamide, se adaugă mediului acid paraaminobenzoic (1/26 000). Incubarea în atmosferă de CO_2, 5—10%, favorizează creșterea meningococului.

După o incubare de 24 de ore la 37°, se face un prim examen microscopic și treceri pe geloză-ascită. În cazul unui rezultat negativ, trecerile pe geloză-ser sau ascită se repetă, la intervale de 24 de ore, timp de 3 zile consecutiv.

Exsudatul rino-faringian recoltat de la bolnavi sau sănătoși (purtători) este diseminat cu ajutorul tampoanelor pe toată suprafața unei plăci Petri, conținînd geloză-ascită, geloză-ser sau geloză-sînge. După o incubare de 24 de ore la 37°, coloniile suspecte sînt examinate microscopic și însămînțate în medii de fermentare (pentru identificare).

Identificarea coloniilor de meningococ poate fi îngreunată de prezența speciilor nepatogene de *Neisseria*, cu caractere morfologice identice cu ale meningococului, frecvente în nazo-faringe, chiar la oameni sănătoși.

Cercetarea purtătorilor de *Neisseria meningitidis* trebuie practicată prin examene repetate.

Materialele din cadavru (lichid cefalorahidian, exsudate, sînge, splină etc.) se cercetează conform procedeelor mai sus indicate.

Dezvoltarea de colonii „S'' rotunde, translucide, ușor emulsionabile, numai pe medii cu ser, ascită, sau sînge, presupune prezența *N. meningitidis*. Coloniile suspecte vor fi examinate microscopic pe frotiuri colorate prin metoda Gram și apoi trecute pe geloză-ascită, în vederea examinării lor ulterioare din punct de vedere biochimic și serologic.

Metode serologice. Pentru completarea identificării germenului izolat se determină tipul de *N. meningitidis*, prin :

a) *Reacția de aglutinare*: se prepară din cultură izolată o suspensie, cu densitatea de 1 miliard de germeni / ml, dintr-o cultură de 24 de ore pe mediu agar-ascită. Se fac diluții din serul polivalent și serurile de tip de la 1/25 pînă la titrul serului, conform indicației de pe fiolă.

Într-o serie de tuburi de aglutinare se repartizează cîte 0,5 ml din fiecare diluție de ser aglutinant, la care se adaugă cîte 0,5 ml din suspensia de germeni dinainte preparată. Citirea se face după 2 ore la 37°.

b) *Reacția de precipitare*: pentru a se obține un diagnostic rapid în cazuri de puternică autoliză a meningococilor (cu examen microscopic direct negativ) se repartizează într-un tub de precipitare 0,5 ml lichid cefalorahidian, centrifugat, sub care se adaugă în fundul tubului, încet, 0,5 ml ser polivalent antimeningococic. În caz de meningită cerebro-spinală epidemică, se formează un inel de precipitare.

Dacă reacția este negativă, se menține încă o oră la 37° sau se agită și se pune la 55°, citirea reacției se face după 2 ore de menținere la această temperatură și după o noapte la ghețar.

Reacția de precipitare nu exclude însămînțarea obligatorie a lichidului pe medii selective, înainte de centrifugare.

c) *Reacția de umflare a capsulei*. Cînd lichidul cefalorahidian conține germeni numeroși, tipul serologic al meningococului se poate identifica, dacă tulpinile sînt capsulate și după tehnica umflării capsulei, ca la pneumococ. Pentru aceasta se pune pe lamă cîte o picătură din serurile meningococice monovalente, specifice, peste care se adaugă cîte o picătură de lichid cefalorahidian în care există *N. meningitidis*. În caz pozitiv se constată umflarea capsulei.

Inocularea la șoarece. Lichidul cefalorahidian (examen microscopic bacteriologic negativ) este inoculat intraperitoneal la șoarece : după 2 ore, din exsudatul peritoneal se repartizează cîte o picătură pe mai multe lame bine flambate, peste care se adaugă cîte o picătură din antiserurile specifice. Prin această metodă se poate urmări la microscop : umflarea capsulei (la tulpinile capsulate), aglutinarea și liza (complementul este prezent în exsudatul peritoneal).

Epidemiologie

Cea mai mare epidemie de meningită cerebro-spinală epidemică citată în istoria medicinei a fost epidemia din anul 1905 din Silezia de Sus, cu 3000 de îmbolnăviri și 2000 de decese.

Sursele de infecție sînt: omul bolnav, purtătorii convalescenți și purtătorii sănătoși; cei din urmă pot întrece ca număr de 10—20 de ori bolnavii care prezintă simptome manifeste.

Căile de propagare a infecției sînt:

a) calea aeriană (cea mai frecventă) și

b) contactul indirect (cale excepțională din cauza rezistenței mici a agentului patogen, în mediul extern).

Receptivitatea colectivităților joacă un rol însemnat; se îmbolnăvesc mai ales copiii și tinerii veniți de la sate în orașe, care nu au făcut boala în copilărie; aglomerările favorizează epidemiile de meningită cerebro-spinală epidemică.

Sezonul de apariție a cazurilor este primăvara (martie, aprilie, mai). Este important de notat că atît meningita tuberculoasă, cît și alte meningite cu etiologie bacteriană diferită, apar tot în acest anotimp. Această constatare impune într-o largă măsură folosirea metodelor bacteriologice de diagnostic.

Mulți autori atribuie un rol important scăderii rezistenței organismului în determinarea localizării meningiene a agentului patogen; s-au observat deseori epidemii printre soldați, după marșuri forțate.

În orașe este foarte dificilă urmărirea filiațiunii cazurilor, deoarece numărul mare de rinofaringite, ca și al purtătorilor sănătoși, nu se depistează de obicei cu ocazia anchetei epidemiologice.

Profilaxia se realizează prin izolarea bolnavilor, depistarea purtătorilor sănătoși și tratamentul lor cu sulfamide.

Bolnavii sînt izolați atîta timp cît mai elimină agentul patogen; uneori sînt necesare 2—3 săptămîni, după vindecarea clinică.

Se aplică o dezinfecție continuă la patul bolnavului și în jurul purtătorilor.

Chimioprofilaxia nu a fost suficient experimentată pentru a fi curent aplicată, însă, practic cercetarea purtătorilor de meningococi în epoca sulfamidoterapiei, devine iluzorie (Crosnier).

Neisseria catarrhalis

Istoric. Frosch și Kolle (1896) au descris acest germen sub denumirea de *Micrococcus catarrhalis*. Mai tîrziu (1902) a fost studiat de către Pfeiffer și Ghon și apoi în 1920 de către Holland.

Habitat. Se găsește în căile respiratorii ale omului, în secreția nazofaringiană, salivă, în mucoasa căilor respiratorii, adeseori asociat cu alți germeni.

Morfologie și colorabilitate. Caractere morfologice identice cu *Neisseria meningitidis*. Se colorează ușor cu coloranți de anilină; gram-negativ.

Caractere de cultură. Nu este un germen microbian pretențios; crește bine pe mediile simple (geloză, bulion) la 37° și la 22°.

În bulion se dezvoltă bine, tulbură uniform mediul, apoi formează un depozit și văl.

Pe geloză sau geloză-ascită cresc 2 feluri de colonii:

a) colonii „S", rotunde, mici, ușor bombate, albe-cenușii, translucide, netede, emulsionabile;

b) colonii „R", de 1,5 mm diametru, rotunde, cu margini neregulate, cu suprafață uscată, de culoare cenușie, opace, avînd o consistență mai mare.

Pe agar cu sînge formează colonii fine, rotunde, ușor convexe, de o culoare albă-cenușie sau albă-murdară.

Dezvoltarea are loc în condiții de aerobioză și anaerobioză facultativă.

Caractere biochimice și de metabolism. Nu fermentează nici un zahăr. Produce oxidaze.

Rezistența la agenți fizici, chimici și biologici este asemănătoare cu *N. meningitidis*.

Structura antigenică nu este clarificată. Suspensiile de *N. catarrhalis* în ser fiziologic prezintă deseori o aglutinare spontană.

Caracterele de patogenitate sînt cunoscute numai din observații clinice și experimentale (la cobai); nu s-a putut demonstra nici prezența unei exotoxine sau endotoxine active.

Boala la om și la animale. La om provoacă foarte rareori meningite și septicemii; pe lîngă aceste boli, *N. catarrhalis* contribuie ca un germen de asociație, la producerea altor afecțiuni ale căilor respiratorii (nazo-faringe, bronhii, plămîni).

La animale nu produce îmbolnăviri naturale.

Infecția experimentală. Unii autori pretind că au obținut infecția experimentală la cobai.

Imunitatea pînă în prezent nu este clarificată.

Tratamentul specific se realizează prin antibiotice și prin vaccinoterapie (tetravaccinul preparat cu streptococi, *H. influenzae*, *D. pneumoniae* și *N. catarrhalis*).

Diagnosticul de laborator se practică prin examinarea produselor patologice ca:

a) lichid cefalorahidian;

b) secreții din căile respiratorii;

c) sînge.

Metodele de examinare sînt identice cu cele expuse la *N. meningitidis*.

Izolarea unui diplococ gram-negativ, cu caracterele morfologice ale germenilor din genul *Neisseria*, aspectul coloniilor, dezvoltarea pe medii simple și absența fermentării zaharurilor confirmă diagnosticul de *N. catarrhalis*.

Nu se utilizează metode serologice în practică.

Epidemiologie. *N. catarrhalis* provoacă numai îmbolnăviri sporadice; pînă în prezent nu se cunosc epidemii cauzate de acest germen.

Neisseria gonorrhoeae şi infecţiile gonococice

Conf. V. Bîlbîe

Marea eficacitate a chimio- şi antibioterapiei a determinat social-economic şi o însemnată reducere a morbidităţii gonococice. Importanţa cunoaşterii microorganismului cauzator al infecţiilor gonococice este determinată de modificările clinice şi microbiologice consecutive antibioterapiei, de relativa creştere a frecvenţei uretritelor negonococice şi îndeosebi de sarcina rapidei lichidări a infecţiilor gonococice în ţara noastră.

Clasificare. Specia tip *Neisseria gonorrhoeae* aparţine genului *Neisseria*, familia *Neisseriaceae*.

Sinonime: *Gonococcus*; *Micrococcus gonorrhoeae*; *Diplococcus gonorrhoeae* etc.

Istoric. Este verosimil ca infecţiile gonococice să fi fost cunoscute în antichitate la popoarele din Extremul Orient şi la cele din Lumea Veche. Termenul impropriu de *gonorrhoeae* (*gone* = spermă; *rhoia* = = scurgere) a rămas de la Galen. Individualizarea clinică a gonoreei a fost realizată de Ricord. În perioada prepasteuriană, Noeggerath a subliniat infecţiozitatea gonoreei; ulterior, alţi cercetători au descris diferite microorganisme drept agenţi cauzali. Neisser (1879) descrie gonococii în puroiul blenoragic. Primele culturi sînt realizate de Leistikow (1882). Loeffler şi Bum (1884); ultimul folosind culturi, realizează transmiterea experimentală la om. Finger, Ghon şi Schlangenhaufer (1894) studiază histopatologic infecţia gonococică umană experimentală. Cercetările din anul 1906 ale lui Bruckner şi Cristeanu, care arătau înrudirea antigenică dintre gonococ şi meningococ, au fost confirmate şi completate datorită metodelor moderne de imunochimie (Boor şi Miller, 1944).

Habitat. Strict adaptat la specia umană, *N. gonorrhoeae* nu a fost observat la alte animale. La om, *N. gonorrhoeae* poate fi găsit în leziunile caracteristice. La bolnavii netrataţi sau insuficient trataţi, gonococii pot persista ani de zile, într-o stare latentă, analogă celei saprofite, mai ales în glandele anexe ale aparatului uro-genital. Existenţa gonococilor în afara organismului uman este întîmplătoare şi de foarte scurtă durată.

Caractere morfologice: diplococ gram-negativ, nesporulat, neciliat, necapsulat, imobil. Almaden (1938) a obţinut variante mucoide capsulate prin treceri repetate pe agar cu 0,2% nitrat de potasiu și 30% albuș de ou hidrolizat. Caracterele morfologice tipice se observă în preparatele microscopice din exsudatul formelor acute ale infecției gonococice: coci asimetrici, grupați cîte doi, cu fețele adiacente ușor concave, sugerînd imaginea „boabelor de cafea", gram-negativi, intracelulari, uneori extracelulari, cu dimensiuni uniforme (0,6—1 μ). Pe măsura cronicizării infecției, se reduce numărul gonococilor extracelulari și apar variații dimensionale și tinctoriale. În exsudatele provenite de la bolnavii tratați cu antibiotice se observă modificări morfologice și mai pronunțate, coci foarte mici alături de coci „giganți", apariția de gonococi gram-pozitivi etc. În culturile tinere, la tulpinile recent izolate se păstrează aspectul caracteristic de diplococ gram-negativ, uniform ca dimensiuni și colorabilitate. În culturile vechi, polimorfismul este evident, cocii sînt de dimensiuni inegale, rareori în diplo, uneori izolați, frecvent grupați în grămezi, în tetrade, dar nu în lanțuri. Alături de cocii normal colorați se observă coci slab colorați sau coci colorați intens.

Caractere de cultură. Gonococii nu cresc pe mediile obișnuite. Pentru cultivarea gonococilor sînt necesare medii cu ser, lichid de ascită, extract de ficat, extract de levuri, sînge uman sau animal, sînge încălzit la 56°, sînge defibrinat, hemoglobină, plasmă de cal, extract globular etc. Dezvoltarea optimă se face la pH 7,4—7,6. După numeroase treceri pe geloză-sînge, se pot obține uneori culturi și pe mediile uzuale. Izolarea și cultivarea gonococilor se realizează în aerobioză în prezența unei proporții de 10% CO_2 la temperatura de 36—37°. Cercetări mai vechi (Neuman) au arătat posibilitatea de a izola tulpini anaerobe pe geloză-sînge de cal. În mediile lichide (bulion-ascită, bulion-ser etc.), gonococii au o creștere slabă, evidentă în 3—5 zile, cînd se observă o peliculă fină, o ușoară turbiditate a mediului și un depozit foarte redus. Pe mediile solide (agar-ascită, agar-ser etc.) se observă după 48 de ore colonii de dimensiuni reduse, rotunde, cenușii, oarecum vîscoase, ușor transparente etc. Atkin a descris (1925) pe mediul cu triptoză-agar colonii denumite de tip I, mari, turtite, transparente, cu contur neregulat și cu posibilitatea de a produce colonii secundare și colonii denumite de tip II, mici, ușor convexe, opace etc., la care nu apar colonii secundare. Kașkin (1939) descrie 5 tipuri de colonii diferențiate după dimensiuni, culoare și aspectul suprafeței.

Caractere biochimice și de metabolism. Gonococul fermentează glucoza și xiloza cu formare de acid, fără gaz. Nu fermentează celelalte zaharuri. Unele tulpini pierd capacitatea de a fermenta glucoza. Metaboliți esențiali: vitaminele din grupul B, glutamina, cistina etc. Sintetizează indofenoloxidaza. Reduce albastrul de metilen. Nu formează amoniac, indol sau H_2S. Prezintă catalază, nu prezintă hemolizine. Cercetările mai noi au demonstrat cultivarea gonococului pe medii sintetice și semisintetice. Elinov cultivă gonococii în culturi de leucocite umane. După Miller (1932), ionii de K și Na nu sînt toxici, chiar dacă sînt în cantități mari. Ionii de Ca și Mg sînt necesari în cantități mici.

Rezistența la agenți fizici, chimici și biologici. Gonococii din puroiul supus uscării mor în 2—3 ore; culturile expuse uscării și luminii mor în 1—2 ore. Gonococii au zona optimă de dezvoltare între 30° și 38°. Prin căldură umedă, gonococii sînt omorîți la 42° în 5—15 ore, iar la

55° în mai puțin de 5 minute. La temperatura camerei, culturile mor în 1—2 zile, la 37° culturile mor în 3—4 zile. Durata viabilității pe mediile de cultură și ca urmare frecvența repicărilor variază cu mediul folosit. Realizarea anaerobiozei prin interpunerea unui strat de ulei de parafină steril împiedică acidifierea mediului și formarea de peroxizi și prelungește viabilitatea culturilor de gonococi pînă la 4—5 săptămîni. Acțiunea microbicidă rapidă a principalelor antiseptice este cunoscută (nitrat de Ag 1/400, 2—7 minute; sublimat 1‰ — 5 minute; protargol 4% — 5 minute; formol 1‰ — 2—3 minute etc.). Cristalul violet 1/600 000 nu este bacteriostatic și de aceea este folosit în mediile selective. Polianetolul sulfonat de sodiu 1‰ nu împiedică creșterea gonococului. Sulfamidele, penicilina, streptomicina, aureomicina, teramicina etc. sînt active față de gonococ. Unii constituenți ai peptonelor sau ai agarului (acizi aminați; acizi grași) inhibează creșterea gonococilor, iar adăugarea sîngelui, serului etc. la mediile cu agar-peptonă ar determina creșterea gonococilor, atît prin factorii de creștere pe care îi conțin, cît și prin adsorbția inhibitorilor.

Structura antigenică. Deși s-au publicat numeroase cercetări, structura antigenică a gonococilor continuă să rămînă o problemă neclarificată, fără aplicații practice. Prepararea serurilor aglutinante antigonococice este foarte dificilă. Grupurile și subgrupurile serologice propuse în primele 3 decenii ale secolului al XX-lea au o importanță istorică, deoarece au fost infirmate de numeroase lucrări de control. Atkin (1925) precizează existența a două tipuri serologice (I și II) în raport cu cele două feluri de colonii descrise. Casper (1938) completează lucrările lui Atkin și arată existența a două tipuri serologice, a căror specificitate este determinată de polizaharizii extrași cu taurocolat. Gonococii izolați din infecții acute aparțin primului tip. Recent, Chanarin, cu tehnica de hemaglutinare indirectă, confirmă existența a două serotipuri. Unele antigene gonococice sînt comune cu alte neisserii. Aglutinogenul gonococic este diferit de cel meningococic, în schimb nucleoproteidele gonococice dau reacții de precipitare încrucișată cu nucleoproteidele meningococice, pneumococice și ale micrococilor catarali.

Caractere de patogenitate. Nu s-a putut pune în evidență o exotoxină. Culturi omorîte au produs în experiențe mai vechi (Morax și Elmassian) reacții conjunctivale intense (edem, hiperemie și reacție purulentă) care au durat 5—6 ore. Endotoxina glucido-lipido-polipeptidică este termostabilă, toxică pentru animalele mici de laborator pe care le omoară pe cale intracerebrală. La om determină o scurgere caracteristică în urma instilării uretrale și reacții locale cu ascensiuni termice, în cazul introducerii subcutanate.

Boala la om. Gonococul produce o infecție acută locală. În cazul că nu beneficiază de metodele moderne de tratament, se cronicizează și evoluează cu numeroase complicații și chiar ca o infecție generală cu localizări secundare, de obicei seroase. Frecvent, forma clinică inițială este uretrita acută la bărbat și uretrovulvovaginita acută la femeie. Localizările neveneriene, ca oftalmia gonococică și altele, sînt rare. Ca urmare a unui raport sexual infectant și după o incubație medie de 3—5 zile, gonococii ating mucoasa uretrală la bărbat la nivelul fosei naviculare. Integritatea mucoasei uretrale nu constituie o barieră pentru gonococi. Exsudatul masiv determinat de pătrunderea gonococilor disociază celulele epiteliale, iar gonococii pătrund în corionul mucos și în glandele mucoasei uretrale. Aspectul anatomopatologic este asemănător și în cazul conjunctivitei gonococice (Babeș). De la leziunile inițiale, extinderea infecției se realizează din aproape în aproape, sau pe cale canaliculară la glandele anexe ale aparatului uro-genital, sau pe cale limfatică și sanguină la alte organe. Principalele forme clinice la bărbat: uretrita acută și cronică, cowperita, epididimita, prostatita acută și cronică, veziculita etc. La femeie se observă: uretrite, vaginite, bartholinite, endocervicite, endometrite, anexite etc. Se descriu și rectite, cistite, pielite sau alte localizări gonococice neobișnuite. Infecția generală este consecutivă unei leziuni cronice, profunde, de unde pe cale sanguină gonococii ajung în circulația generală și de aci la nivelul seroaselor articulațiilor mari, endocardului etc.

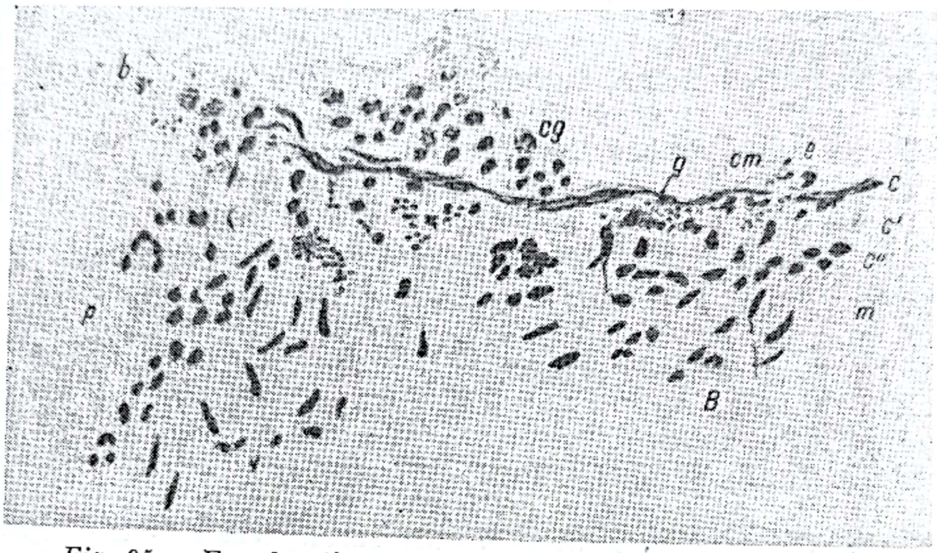


Fig. 95. — Exsudat din conjunctivita gonococică (după Babeș).

Infecția experimentală. Stricta patogenitate pentru om a gonococului face ca datele asupra infecției experimentale să fie limitate. Infecția experimentală la animale a fost încercată pe numeroase specii și prin cele mai diferite căi, inclusiv calea uretrală, fără a se putea obține un model experimental adecvat sau leziuni caracteristice. Inocularea la iepure a unei culturi de gonococ, în camera anterioară a ochiului, produce o iridociclită supurată cu panoftalmie și cu posibilitatea de a reizola gonococii după 13—28 de zile. Infectarea experimentală a embrionului de găină de 12—13 zile asigură multiplicarea gonococilor. Suspensii gonococice introduse intraperitoneal la șoarece cu cantități corespunzătoare de mucină, gălbenuș de ou, geloză semilichidă etc., ar permite multiplicarea *in vivo* a gonococilor.

Imunitatea. Infecțiile gonococice, indiferent de forma și localizarea lor, nu determină o stare de rezistență specifică. Reinfecțiile și autoreinfecțiile constituie regula. În sîngele bolnavilor au fost puse în evidență aglutinine, precipitine etc., dar apariția lor tardivă și inconstantă, cu toate încercările efectuate, fac imposibilă folosirea datelor obținute în scop diagnostic sau pentru indicații prognostice. Cercetări numeroase au fost întreprinse asupra anticorpilor fixatori, dovedindu-se că reacția de fixare a complementului pune în evidență starea de infecție ocultă la indivizii aparent sănătoşi. La foşti bolnavi complet vindecaţi, o excitare antigenică specifică şi chiar nespecifică determină pozitivarea R.F.C. La persoane sănătoase, care nu au prezentat infecţii gonococice, vaccinarea antigonococică poate determina pozitivarea R.F.C. Testele cutanate cu alergene gonococice (filtrate de culturi, polizaharizi gonococici etc.) dovedesc existenţa hipersensibilităţii specifice la bolnavii cu infecţii gonococice, dar sînt insuficient de sensibile şi de specifice pentru a putea fi utilizate ca metode de diagnostic.

Tratament specific. Scroterapia prezintă interes istoric. Rezultatele ei au fost inconstante, nesigure şi însoţite de riscuri. Vaccinoterapia se realizează cu vaccinul antigonococic, care este o suspensie de 1 miliard celule microbiene pe ml, preparat din 10—15 tulpini recent izolate. Sterilizarea suspensiei native se face prin încălzire 30 de minute la +56°. Se adaugă ca prezervant fenol 3—4 ‰. Vaccinoterapia „nu vaccinează", aşa cum s-a presupus cînd s-a introdus această metodă, ci acţionează prin desensibilizare, ceea ce s-a dovedit prin ineficacitatea vaccinoterapiei în formele acute, cînd starea alergică nu este instalată şi prin dispariţia stării alergice la indivizii trataţi cu vaccin antigonococic. Este utilă în formele cronice cu complicaţii rezistente la antibiotice. Chimioterapia şi antibioterapia determină dispariţia rapidă a gonococilor din leziuni, urmată de vindecare rapidă. Datorită frecvenţei crescute a tulpinilor de gonococ sulfamidorezistente şi marii eficacităţi a antibioterapiei, sulfamidoterapia este practic depăşită. Se folosesc, în ordine de importanţă, penicilina, streptomicina, cloramfenicolul, tetraciclinele etc. Persistenţa gonococilor în repere anatomice, în care este practic greu de realizat concentraţii utile de antibiotice, constituie un factor determinant în producerea tulpinilor rezistente la acest antibiotic (Goloşina).

Diagnosticul de laborator

Recoltarea produselor patologice. În formele clinice de dată recentă şi netratate, recoltarea este simplă. Puroiul gonococic este prelevat cu ansa, cu tampoane speciale etc. şi folosit pentru prepararea frotiurilor, pentru însămînţări etc. În formele cronice, tratate, la bărbat, recoltarea este dificilă, necesitînd precauţii şi tehnici speciale (recoltarea picăturii „matinale", prelevarea filamentelor din urină, cercetarea gonococilor în sedimentul urinar, masajul uretrei sau prostatei, metoda „provocărilor" sau „reactivărilor" locale şi generale etc.). Încă mai anevoioasă este recoltarea produselor patologice la femei. Se recoltează concomitent secreţia de la nivelul orificiului uretral, colului uterin, orificiului glandelor Bartholin etc. Recoltarea acestor secreţii în timpul şi la sfîrşitul menstruaţiei este recomandabilă. Se folosesc metode speciale de „reactivare" locală (Kaplun), printre care introducerea a 1 ml din soluţie de NaCl 10% în stratul submucos al colului uterin. Ca metodă biologică de „reactivare" se mai folosesc vaccinul antigonococic, vaccinul T.A.B. etc., introdus cu precauţii subcutanat sau intravenos.

Examenul microscopic. Examinarea frotiurilor colorate după metodele Gram, albastrul de metilen, formol-eozină, Pick-Iacobson etc. este edificatoare în infecţiile acute, mai ales la bărbat. Pentru coloraţia Gram se recomandă : evitarea fixării la flacără, prelungirea cu un minut a acţiunii soluţiei Lugol, decolorarea prelungită şi recolorarea cu fucsină diluată 20 de secunde.

Metoda colorării cu formol-eozină (după Sinai şi Birger): frotiurile uscate şi nefixate se acoperă timp de 2 minute cu formol-eozină alcoolată (eozină 1% în alcool 60° şi 0,5 ml formol). Se înlătură colorantul fără spălare. Se colorează 30 de secunde cu o soluţie apoasă 0,5% albastru de metilen. Se spală şi se usucă. Metoda Pick-Iacobson: se prepară un amestec extemporaneu din fucsină bazică fenicată 1%, XV picături, soluţie alcoolică saturată de albastru de metilen XV picături şi 20 ml apă distilată. Se acoperă lama timp de 10 secunde cu acest amestec. Se spală cu apă şi se usucă. Gonococii apar coloraţi în albastru, iar celulele epiteliale şi leucocitele polimorfonucleare cu citoplasma roz şi nucleii albaştri. Se cercetează morfologia caracteristică a gonococilor, tinctorialitatea, dispoziţia lor frecvent intracelulară şi caracterele citologice ale exsudatului. Examenul microscopic este concludent cînd se observă diplococi gram-negativi, tipici morfologic, dispuşi intracelular şi mai rar extracelular şi numeroase leucocite polimorfonucleare, celule epiteliale şi absenţa altor microorganisme. Dacă se constată diplococi gram-pozitivi sau o floră asociată polimorfă care îngreunează observarea morfologiei caracteristice a gonococilor, examenul microscopic nu este concludent. În acest caz, ca şi în toate cazurile cînd nu se observă gonococi tipici, este indispensabilă însămînţarea produselor recoltate, care măreşte şansele de punere în evidenţă a germenilor cu 40–50%.

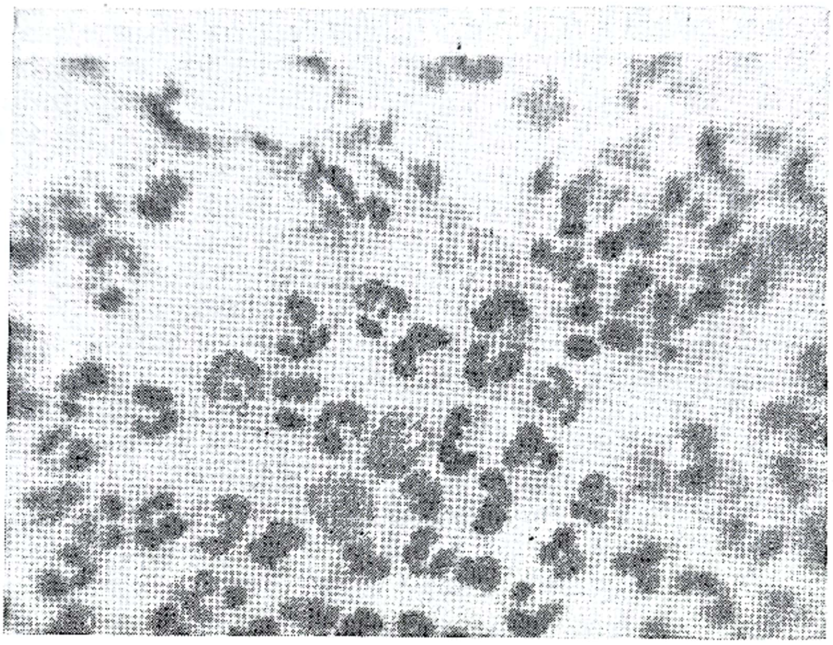


Fig. 96. — Secreţie uretrală cu gonococ.

Însămînţarea produselor patologice. Rezultatele însămînţărilor depind de numeroşi factori care ţin de produsul recoltat, de mediul de cultură, de modul de însămînţare şi cultivare ulterioară. Recoltarea se face dimineaţa, înaintea oricărei micţiuni sau toalete, la indivizi care de 1–2 zile nu au primit antibiotice sau sulfamide pe cale generală şi nu au făcut tratamente locale cu antiseptice. Este necesar să se reducă la minimum posibil timpul dintre recoltare și însămînțare, evitîndu-se transportul cu variațiile de temperatură inerente. Dacă aceasta nu este posibil, este indispensabil să se folosească un mediu „de transport" care prin conținutul său în substanțe reductoare inhibează enzimele autolitice gonococice și asigură supraviețuirea gonococilor timp de 18—20 ore în condiții termice variabile.

Unul din mediile de transport este cel propus de Moffet, Young și Stuart (1949) care s-a dovedit corespunzător.

Compoziție:	Apă distilată gelozată 0,3%	190	ml
	Acid tioglicolic	0,2	ml
	Soluție 20% de glicerofosfat de Na	10	ml
	Soluție 1% de Cl_2Ca	2	ml
	Soluție albastru de metilen 1%	0,04	ml

Se repartizează cîte 2 ml în tuburi 10×120 mm.

Sterilizarea la 108° timp de 20 de minute. Mediul este incolor sau cu o ușoară nuanță verzuie. Dacă capătă o culoare albastră, nu mai poate fi utilizat. Tampoanele cu care se prelevă se introduc în tuburile cu mediul de transport și se trimit în aceeași zi la laborator. Mediile de cultură pentru izolare (geloză-ascită, geloză șocolat etc.) trebuie să fie proaspete și aduse la temperatura de 37° în momentul însămînțării. Rezultate superioare în izolarea gonococilor se obțin prin folosirea mediului de izolare descris de Peizer și Steffen și modificat de Le Minor, care este preparat astfel:

Mediul 1

Peptonă peptică	20	g
ClNa	5	g
Geloză	25,5	g
Apă distilată	1000	ml

pH se ajustează la 7,4 cu Na_2HPO_4; se sterilizează la 110° timp de 20 de minute.

Mediul 2

Plasmă sterilă de cal	15	ml
Hemoglobină sterilă de cal 5% (preparată din hematii de cal 5 ml și apă distilată 95 ml)	25	ml
Soluție de glucoză 30% sterilă	0,35	ml
Soluție 15% de Na_2HPO_4 sterilizată prin filtrare	5	ml

Mediul de izolare se prepară prin lichefierea mediului 1 și răcire la 50°. Se prelevă 150 ml din mediul 1, căruia i se adaugă aseptic 46 ml din mediul 2, se amestecă și se toarnă rapid în plăci Petri sterile. Mediile 1 și 2 se pot păstra luni de zile la frigider. Plăcile cu mediul final se pot păstra 7 zile la frigider. Însămînțarea produsului patologic în plăci se face abundent cu tamponul sau cu ansa. Se mențin la 37° timp de 48 de ore, din care primele 24 de ore în atmosferă de CO_2 10%. În asemenea condiții se observă colonii caracteristice mici, transparente, convexe, cu margini regulate etc., care se repică pe geloză-ascită, geloză-șocolat etc.

Valoarea spermoculturii a fost supraapreciată, iar interesul ei practic este redus.

Hemocultura se practică în septicemii, cînd se prelevă circa 20 ml sînge în timpul ascensiunilor termice şi se însămînţează 300—400 ml bulion-ascită cu polianetol sulfonat de sodiu 1‰, penicilinază etc.

Identificarea gonococilor. Se realizează folosind următoarele metode:

a) *Testul oxidazelor* (Gordon-McLeod). Se prepară extemporaneu, după posibilităţi, una din următoarele 2 soluţii:

1) Dimeti-parafenilen-diamin	0,1 g
Soluţie clorurosodică 9‰	10 ml
2) Tetrametil-parafenilen-diamin	0,1 g
Soluţie clorurosodică 9‰	10 ml

Se observă plăcile cu mediul Peizer-Steffen însămînţate şi se notează coloniile ale căror caracteristici pledează pentru gonococ.

Se depun pe aceste colonii 1—2 picături din una sau alta din cele 2 soluţii. Se observă 10—20 de minute. Dacă pînă la 10 minute coloniile devin roze-roşii purpurii şi după 20 de minute maron-negru, testul oxidazelor este pozitiv.

b) *Fermentarea glucozei* fără fermentarea maltozei şi zaharozei. Testul de fermentare se efectuează pe mediul Hiss căruia i se adaugă ascită 2%.

Diferenţierea speciilor aparţinînd genului *Neisseria* este arătată în tabelul XVII.

Tabelul XVII

	Creşterea pe bulion-ser	Creşterea pe medii simple	Creşterea la +22°	Sensibilitate la antibiotice	Fermentarea		
					glucoză	maltoză	zaharoză
N. gonorrhoeae	Sediment redus	—	—	+	A	—	—
N. intracelularis	Turbiditate şi sediment	—	—	+	A	A	—
N. catarrhalis	Inel, văl, sediment	+	+	—	—	—	—

Diagnosticul de laborator al infecţiilor gonococice comportă şi un diagnostic diferenţial cu uretrite negonococice: uretrite tuberculoase, uretrite cu *Haemophilus vaginalis* (bacil mic, gram-negativ, imobil, anaerob, polimorf, cultivă pe medii cu sînge etc.), uretrite produse de *Trichomonas vaginalis*, uretrite candidomicotice produse de *Candida albicans*, uretrite virotice cu incluzii citoplasmatice în celulele epiteliale, uretrite produse de organismele L, uretrite alergice, chimice, mecanice etc. Existenţa acestor uretrite impune ca, paralel cu cercetarea gonococului, atenţia microbiologului să fie îndreptată şi către aspectele particulare ale unei uretrite negonococice, iar în absenţa gonococului investigaţiile de laborator în această direcţie să fie aprofundate.

Diagnosticul serologic poate fi realizat prin R.F.C., practicată după tehnica Calmette-Massol. Divergenţele privind valoarea R.F.C. în infecţiile gonococice sînt determinate de antigenele foarte variate folosite în cercetările publicate (culturi vii, extracte lipoidice, extracte acetono-alcoolice, antigene colesterinate, nucleoproteine specifice, polizaharizi și proteine gonococice, autovaccinuri, culturi autoclavate, antigene cu antiformină, lizate etc.). Un bun antigen pentru R.F.C. trebuie să fie preparat din minimum 8–10 tulpini recent izolate, să conțină inițial 3–4 miliarde de celule microbiene pe ml, iar extracția propriu-zisă să se facă 24–48 de ore la frigider. R.F.C. este negativă în infecția acută și devine pozitivă după 21–28 de zile de boală. Valoarea R.F.C., practicată cu un bun antigen, se verifică în infecțiile cronice, mai ales la femei și în localizările gonococice articulare. Rezultatele pozitive la bolnavii supuși vaccinoterapiei sau cele care nu concordă cu datele clinice sînt lipsite de valoare practică (Ovcinikov, 1953).

Recent, microscopia anticorpilor fluorescenți a dat o tehnică utilă în acest domeniu. Serurile antigonococice s-au pregătit pe iepuri cu suspensii gonococice formolizate. Antigenul specific tip K este rezistent la formol și prezent în gonococii din produse patologice și culturi recent izolate. Serurile antigonococice au fost absorbite pe suspensii de meningococi și apoi au fost folosite în frotiuri de exsudate provenite de la bărbați sau în frotiuri din culturi de 16–20 de ore provenite de la femei, pentru vizualizarea fluorescentă a gonococilor.

Epidemiologie

Contagiunea directă pe cale sexuală de la bolnavi și mai ales de la bolnave cu forme cronice, oligosimptomatice, determină transmiterea și răspîndirea infecției gonococice. Pentru profilaxia oftalmiei gonococice a nou-născutului se aplică, ca măsură generală, instilații cu nitrat de Ag 1% pe conjunctiva bulbară îndată după naștere. Contagiunea indirectă are practic un rol foarte redus în răspîndirea bolii.

Familia Enterobacteriaceae

Prof. N. Nestorescu, dr. Marcella Popovici

Printre germenii patogeni și comensali cu habitat natural în intestinul omului și animalelor se află o vastă familie de bacterii, cunoscută sub numele de familia Enterobacteriaceelor.

Germenii aparținînd acestei familii se caracterizează prin următoarele particularități: bacili (1—3 μ lungime, 0,4—0,6 μ grosime), mobili, cu cili dispuși peritrich sau, dimpotrivă, imobili. În ultima vreme a fost descrisă la unele tulpini de Enterobacteriacee prezența fimbriilor (Duguid, 1955; Brinton, 1955), deosebite de flageli atît ca morfologie, cît și ca structură antigenică. Enterobacteriaceele nu posedă spori, sînt gram-negative, se dezvoltă ușor pe medii de cultură obișnuite, fermentînd glucoza, cu sau fără producere de gaz, și reducînd nitrații în nitriți.

Ținînd seamă de habitatul lor obișnuit — intestinul — care le oferă condiții ecologice complexe, Enterobacteriaceele se dovedesc de o plasticitate remarcabilă, care le imprimă caractere biochimice, de structură antigenică și de patogenitate din cele mai variate.

Din această cauză, poate la nici o altă familie de germeni nu s-au propus mai multe clasificări taxonomice și de nomenclatură ca în familia Enterobacteriaceelor. Criteriile de clasificare propuse au fost însă foarte variate, ceea ce a făcut ca aceste clasificări să sufere frecvente modificări. Pe de altă parte, aceste clasificări, mai mult didactice, nu erau întru totul în concordanță nici cu criteriile botanice, nici cu nevoile medicale, barierele întrevăzute de aceste clasificări în interiorul familiei neexistînd ca atare în natură. Într-adevăr, familia Enterobacteriaceelor, în interiorul căreia se descriu diferite triburi, grupuri sau genuri, constituie în realitate un lanț neîntrerupt de germeni, numeroase forme intermediare asigurînd legătura de la un grup la altul. Rezultatele experiențelor de hibridizare între diferitele grupe de *Enterobacteriaceae* (*Shigella* și *Escherichia*; *Escherichia* și *Salmonella*; *Escherichia* și *Serratia* etc.), fenomen care are loc probabil și în natură, dovedesc, o dată mai mult, legătura strînsă care există între diferitele grupe ale acestei familii (Luria și Burrows, 1957; Baron, 1959; Mandel, 1960).

În acord cu Bruce White, Kauffmann, Ewing şi Edwards, printre criteriile folosite pentru clasificarea Enterobacteriaceelor se enumeră caracterele biochimice, serologice şi de sensibilitate la bacteriofagii specifici.

În raport cu caracterele biochimice, familia Enterobacteriaceelor a fost împărţită în triburi (Kauffmann, 1954, 1959, 1963) sau diviziuni principale (Ewing şi Edwards, 1960) care, la rîndul lor, cuprind genuri (Kauffmann) sau grupe (Ewing şi Edwards).

Genurile sau grupele cuprind *serotipuri*, diferenţiate la rîndul lor prin structura antigenică.

În fine, în interiorul serotipurilor s-au făcut diferenţieri în tipuri bacteriofagice sau *lizotipuri*, pe baza sensibilităţii lor faţă de bacteriofagii specifici.

Uneori tipurile bacteriofagice se pot şi ele diferenţia, la rîndul lor, mai departe, prin particularităţile biochimice, realizînd aşa-numite tipuri fermentative sau *biotipuri*.

Schematic, o asemenea clasificare se poate reprezenta în felul următor:

Familie — trib (diviziune principală) — gen (grup) — serotip — lizotip — biotip.

Pînă în 1958, un criteriu căruia i s-a acordat o importanţă deosebită a fost fermentarea rapidă sau tardivă a lactozei. De la această dată (Congresul de microbiologie de la Stockholm) s-a propus diferenţierea grupelor biochimice, în raport nu cu un singur caracter, ci cu un complex de reacţii biochimice.

Clasificarea Enterobacteriaceelor făcute după aceste criterii, de către Ewing şi Edwards, în 1960, este cuprinsă în tabelul XVIII.

Tabelul XVIII

Diviziuni principale	Grupuri
Shigella — Escherichia	*Shigella* *Escherichia* (*E. coli*, inclusiv *Alkalescens — Dispar*)
Salmonella-Arizona-Citrobacter (anterior *E. freundii*)	*Salmonella* *Arizona* *Citrobacter* (inclusiv *Bethesda-Ballerup*)
Klebsiella-Aerobacter-Serratia	*Klebsiella* *Aerobacter* *Hafnia* *Serratia*
Proteus-Providence	*Proteus* *Providence*

Testele biochimice pe baza cărora se diferenţiază diviziunile principale sau triburile sînt redate în tabelul XIX.

Tabelul XIX

Diferenţierea principalelor diviziuni ale Enterobacteriaceelor prin metode biochimice
(Ewing–Edwards, 1960)

Test	*Shigella* *Escherichia*	*Salmonella* *Arizona* *Citrobacter*	*Klebsiella* *Aerobacter* *Serratia*	*Proteus* *Providence*
Indol	d	—	—	d
Roşu de metil	+	+	—	+
Voges-Proskauer	—	—	+	—
Mediul Simmons	—	+	+	d
H_2S	—	+	— sau (+)	d
Urează	—	—	— sau (+)	d
KCN	—	d	+	+
Fenilalanină	—	—	—	+
Decarboxilază — acid glutamic	+	—	—	+

Legendă: + = pozitiv în una sau două zile
— = negativ
(+) = pozitiv tardiv
d = diferite tipuri biochimice

Diferenţierea grupelor (genurilor) în interiorul diviziunilor principale se face tot pe baza criteriilor biochimice.

Tabelul XX

Diferenţieri între gupele *Shigella* şi *Escherichia* (Ewing – Edwards, 1960)

Test	Grupul *Shigella*	Grupul *Escherichia*
Fermentarea glucozei cu producere de gaz	x	+(—)
Lactoză	x	+ sau x
Salicină	—	d (aproximativ 80 % +)
Mobilitate	—	+(—)
Lisin-decarboxilază	—	+
Mucat	—	+(—)
Citrat	—	+(—)

Legendă: x = Anumite tipuri de *Sh. flexneri* 6 formează gaz, iar *Sh. sonnei* fermentează lactoza tardiv.
+ = pozitiv în una sau două zile
— = negativ
+(—) = majoritatea tulpinilor pozitive; pot apărea mutante negative
x = pozitiv tardiv şi neregulat
d = diferite tipuri biochimice

Tabelul XXI

Diferențieri biochimice între grupele *Salmonella-Arizona-Citrobacter*
(Ewing-Edwards, 1960)

Substrat sau test	Grupul *Salmonella*	Grupul *Arizona*	Grupul *Citrobacter*
Lactoză	−	+ sau X	+ sau X
Dulcită	+	−	d
Gelatină	−	(+)	−
KCN	−	−	+
Lisin-decarboxilază	+	+	−
Acizi organici malonat	−	+	−
mucat	+	−(+)	+
d-tartrat	+	−	−
Citrat de amoniu	+	+	+

Legendă: + = pozitiv în una sau două zile
− = negativ
(+) = pozitiv tardiv
X = neregulat pozitiv
d = diferite tipuri biochimice

În 1963 Kauffmann propune următoarea clasificare a Enterobacteriaceelor:

Tabelul XXII

Triburi	Genuri
I. *Eschericheae*	1. *Escherichia*
	2. *Shigella*
	3. *Salmonella*
	4. *Citrobacter*
II. *Klebsielleae*	1. *Klebsiella*
	2. *Enterobacter**
	3. *Hafnia*
	4. *Serratia*
III. *Proteae*	1. *Proteus*
	2. *Morganella*
	3. *Rettgerella*
	4. *Providencia*

* În grupul *Enterobacter* sînt incluse *Enterobacter cloacae* (sin. *Aerobacter cloacae*) și *Enterobacter aerogenes* (sin. *Aerobacter aerogenes*).

Tabelul *XXIII*

Diferențieri biochimice între grupele
Klebsiella-Aerobacter-Hafnia și *Serratia* (Ewing-Edwards, 1960)

Test	*Klebsiella*	*Aerobacter*				*Hafnia*		*Serratia*
		A	B	C		37°	22°	
				37°	22°			
Glucoză (fermentare cu gaz)	+	+	+	+	+	+	+	d
Inozită (fermentare cu gaz)	+	—	+	+	+	—	—	—
Glicerol (fermentare cu gaz)	+	—	+	d	(+)	+	+	—
Celobioză (fermentare cu gaz)	+	+	+	d	(+)	+	+	—
Sorbită	+	+	+	+	+	—	—	+
Rafinoză	+	+	+	+	+	—	—	—
Roșu de metil	—	—	—	—	—	+	—	—
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	d	+	+
Lisin-decarboxilază	+	—	+	d	+	+	+	+
Argínindihidrolază	—	+	—	—	—	—	—	—
Ornitindecarboxilază	—	+	+	+	+	+	+	+
Gelatină	—	(+)	X		+		—	+
Mobilitate	—	+	+	+	+	d	+	+

Legendă : subgrupul *A* corespunde lui *Aerobacter cloacae*
subgrupul *B* corespunde lui *Aerobacter aerogenes*
subgrupul *C* corespunde lui *Aerobacter liquefaciens*
+=pozitiv în 1—2 zile
—=negativ
(+)=pozitiv tardiv
X=pozitiv neregulat
d=diferite tipuri biochimice

Tabelul *XXIV*

Diferențieri biochimice între grupele *Proteus-Providence*
(Ewing-Edwards, 1960)

Test	Grupul *Proteus*				Grupul *Providence*
	vulgaris	*mirabilis*	*morganii*	*rettgerii*	
Manită	—	—	—	+	d
Indol	+	—	+	+	+
Mediul Simmons	d	d	—	+	+
H_2S	+	+	—	—	—
Gelatină	+	+	—	—	—
Urează	+	+	+	+	—

Legendă : +=pozitiv în 1 sau 2 zile
—=negativ
d=diferite tipuri biochimice

Diferențierea serotipurilor în interiorul grupelor se face pe bază serologică, în raport cu structura și înrudirile lor antigenice.

Germenii din familia Enterobacteriaceelor pot prezenta următoarele antigene :

antigene somatice („O"), legate de corpul bacterian ;

antigene de suprafață sau de înveliș („K") și

antigene flagelare („H"), legate de cili, prezente numai la tulpinile de germeni mobili.

În afară de aceste antigene, s-au mai descris la formele mucogene ale Enterobacteriaceelor un antigen de natură polizaharidică, denumit antigenul „M”, iar la germenii din grupul *Klebsiella*, un antigen denumit „R”.

Antigenele somatice „O”. De natură glucido-lipido-polipeptidică, antigenele „O” sînt termostabile, rezistînd la fierbere două ore și jumătate; sînt rezistente la acțiunea alcoolului și acidului clorhidric, dar sînt inhibate de formol. Tratînd suspensiile microbiene cu alcool, se obțin antigenele „O” în stare separată.

Introduse în organismul animal, stimulează producția de aglutinine somatice anti-„O”. Puse în contact *in vitro* cu ser imun corespunzător anti- „O”, se supun unui fenomen de aglutinare somatică, granulară, care, examinată microscopic, se dovedește a fi o aglutinare polară, cauzată de unirea germenilor prin capete.

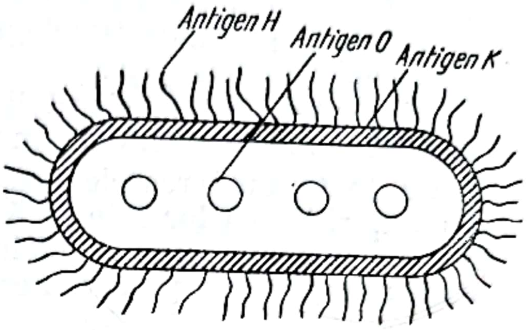


Fig. 97. — Schema așezării diferitelor antigene la germenii din familia *Enterobacteriaceae*.

Antigenele de înveliș „*K*”. Sînt antigene complexe, de suprafață, de obicei de natură glucido-lipido-polipeptidică, diferite însă de antigenele „O”.

Comportarea lor față de agenții fizici și chimici este variată, în raport cu grupul și specia microbiană, căpătînd și denumiri diferite („L”, „A”, „B” la *Escherichia*, „Vi” la *Salmonella* etc.). Datorită așezării lor la suprafața corpului bacterian, conferă germenilor așa-zisa „O”-inaglutinabilitate.

Introduse în organismul animal, stimulează producerea de anticorpi specifici. În contact *in vitro* cu seruri omologe, prezintă o aglutinare de aspect granular.

Antigenele flagelare „*H*” se deosebesc net de antigenele somatice și de cele de înveliș. Sînt de natură proteică, termolabile, pierzîndu-și, la temperatura fierberii, aglutinabilitatea și capacitatea de adsorbție. Inhibate de alcool, antigenele flagelare rezistă la acțiunea formolului, ceea ce îngăduie obținerea lor în stare separată, cînd suspensiile microbiene sînt tratate prin formol.

În organismul animal stimulează producerea de aglutinine flagelare „H”. Puse în contact *in vitro* cu serul corespunzător anti „H”, se supun unui fenomen de aglutinare care se efectuează rapid (în 2 ore), cu aspect floconos, de fulgi de zăpadă, ușor detașabili prin agitare.

Examinată microscopic, aglutinarea flagelară se datorește imobilizării germenilor prin încîlcirea flagelilor.

Redăm schematic așezarea diferitelor antigene la germenii din familia Enterobacteriaceelor (fig. 97).

Diferențieri în interiorul serotipurilor cu ajutorul lizotipiei

Determinarea tipului bacteriofagic permite diferențierea sistematică, dincolo de nivelul speciei (serotipului), scoțînd în evidență lizotipuri diferite, care din punct de vedere biochimic și antigenic se comportă identic. Lizotipia efectuată cu ajutorul unor fagi specifici a putut fi aplicată pînă în prezent la o serie întreagă de specii microbiene aparţinînd grupului *Salmonella*, printre care : *S. typhi*, *S. paratyphi B*, *S. paratyphi A*, *S. typhimurium*. Încercări de lizotipie şi recomandări de scheme provizorii s-au efectuat şi pentru alte specii de *Salmonella*, printre care : *S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. gallinarum-pullorum* etc., precum şi în grupele *Escherichia*, *Shigella* şi *Proteus*. Lizotipurile s-au dovedit stabile, determinarea tipului bacteriofagic dînd bune rezultate în investigaţiile epidemiologice.

Diferenţieri în interiorul lizotipurilor s-au obţinut folosind unele caracteristici biochimice, care au permis stabilirea de biotipuri.

Cu toate numeroasele teste folosite în sistematica Enterobacteriaceelor, clasificarea lor este încă susceptibilă de modificări, criteriile utilizate pînă în prezent fiind încă insuficiente, dacă ţinem seamă de complexitatea interrelaţiilor pe care aceşti germeni le pot stabili.

Tehnici recomandate pentru studiul enterobacteriaceelor

A. *Cercetarea caracterelor morfologice*

1. **Forma şi mobilitatea enterobacteriaceelor** se cercetează în preparate proaspete, examinînd între lamă şi lamelă produsele patologice sau culturi în medii lichide.

Mobilitatea mai poate fi pusă în evidenţă şi prin cultivare în medii gelozate semisolide, folosind unul din următoarele procedee :

a) *Procedeul cu tub în formă de U* (*Vahlne*). Se repartizează agar 0,5% în tuburi în formă de U, confecţionte din ţeavă de pipetă Pasteur, cu diametrul de 8—10 mm. Într-unul din braţele tubului se însămînţează tulpina microbiană de examinat. După incubare la 37°, tulpinile mobile traversează mediul, apărînd în celălalt braţ al tubului, după un interval de timp, variabil cu gradul de mobilitate a tulpinii.

Tulpinile foarte mobile traversează tubul în „U" în cîteva ore, tulpinile slab mobile numai după treceri succesive.

b) *Procedeul cu tub de pipetă împlîntat* constituie o variantă a procedeului de mai sus. Se repartizează mediu gelozat 0,5% în eprubete cu diametrul 17/17, în care se introduce cîte un tub de pipetă, lung de 10 cm şi cu un diametru de 7 mm, deschis la ambele capete. În tubul de pipetă se introduce acelaşi mediu, pînă la un nivel care să depăşească în înălţime, cu 2 cm, nivelul mediului din eprubetă. Cultura de cercetat este însămînţată în interiorul tubului de pipetă. Tulpinile mobile traversează coloana de mediu şi trec prin extremitatea inferioară a tubului, în mediul extern, ieşind la suprafaţa acestuia.

2. **Afinitatea tinctorială** este cercetată pe frotiuri colorate prin metoda Gram. Germenii din familia Enterobacteriaceelor sînt Gram-negativi.

B. Cercetarea caracterelor biochimice și de metabolism

1. Activitatea fermentativă asupra unor zaharuri. Zaharurile mai des folosite pentru cercetarea caracterelor fermentative ale enterobacteriaceelor sînt :

- Monozaharide
  - pentoze
    - arabinoză-l
    - xiloză
    - rhamnoză
  - hexoze : glucoză-*d* (cu tub de fermentare)
- Dizaharide
  - zaharoză
  - maltoză
  - lactoză
  - celobioză
- Alcooli
  - pentavalenți — adonitol
  - hexavalenți
    - manitol (cu tub de fermentare)
    - dulcitol
    - sorbitol

Glucozide — salicină
Cicloze — inozitol

Ca mediu de cultură, se recomandă folosirea mediului cu apă peptonată constituit din :

Apă distilată	1 000 ml
Peptonă	10 g
ClNa	5 g

pH = 7,4

Soluțiile de zahăr se prepară în apă distilată, în concentrație de 10% și se sterilizează 20 de minute la 110°.

Ca indicator se folosește albastrul de bromtimol în următoarea soluție :

Albastru de bromtimol	1 g
NaOH N/10	25 ml
Apă distilată	475 ml

La 1 000 ml apă peptonată se adaugă 12 ml din soluția de indicator.

La mediul conținînd indicator se adaugă soluția de zahăr, în proporție de 1/10, după care amestecul este repartizat în mod steril în tuburi de aglutinare, cîte 1—2 ml de fiecare tub.

Însămînțarea tulpinii de cercetat se face cu ansa, din cultură pe agar, în vîrstă de 18 ore.

Tuburile parafinate sînt incubate la 37° și citite zilnic, eventual timp de 30 de zile.

2. Cercetarea producerii de indol. Se folosește mediul cu apă peptonată indicat mai sus, preparat cu peptonă conținînd triptofan (de exemplu peptona Witte).

Tulpina de cercetat este însămînțată în acest mediu, cu incubare 48 de ore, la 37°. După acest interval de timp, la un tub de cultură, se adaugă 1 ml din unul din următorii reactivi :

a) reactivul Kovacs :

Paradimetilaminobenzaldehidă	5 g
Alcool amilic	75 g
Acid clorhidric	25 g

b) reactivul Ehrlich :

Paradimetilamidobenzaldehidă	4 g
Alcool 96°	380 ml
Acid clorhidric concentrat	80 g

Cînd reacția este pozitivă, apare un strat roșu rubiniu la suprafața mediului, iar în cazul unei reacții negative, reactivul își păstrează culoarea galben brun, inițială.

3. **Reacția la roșu de metil.** Această reacție a fost propusă de către Clark și Lubs, în 1915. Reacția servește la determinarea concentrației ionilor de hidrogen, într-un mediu glucozat și fosfatat, produsă de germeni în cursul procesului de fermentare a glucozei.

Se folosește mediul Clark și Lubs, cu următoarea compoziție :

Peptonă Witte	5 g
Dextroză chimic pură	5 g
Fosfat bipotasic	5 g
Apă distilată	800 ml

Ingredientele sînt dizolvate prin încălzire la vapori fluenți, timp de 20 de minute, urmată de filtrarea mediului prin hîrtie de filtru. După răcire, se aduce mediul la volumul de 1 000 ml cu apă distilată, se distribuie în tuburi cîte 5 ml, după care se sterilizează 3 zile consecutiv la 100°, în autoclavul deschis.

Tulpina de cercetat este însămînțată în mediul de mai sus și după incubare la 37°, timp de 3—4 zile, se adaugă cîteva picături din următorul reactiv :

Roșu de metil	0,1 g
Alcool	300 ml

După dizolvare, se adaugă apă distilată pînă la volum de 500 ml.

Apariția unei culori roz indică o reacție pozitivă (o concentrație ridicată de ioni de hidrogen), pe cînd apariția unei culori galbene, una negativă.

Reacția la roșu de metil începe să devină pozitivă la pH 5,2.

4. **Reacția Voges-Proskauer** se bazează pe producerea în mediu glucozat de acetilmetilcarbinol, care în prezența alcalilor și a oxigenului atmosferic este oxidat în diacetil, care reacționînd cu peptona din mediu produce o culoare roz fluorescentă.

Pentru cercetarea acestei reacții se folosește mediul Clark și Lubs, descris anterior. La cultură de 48 de ore din tulpina de cercetat, se adaugă un volum egal de soluție 10% hidrat de potasiu.

Citirea reacției se efectuează după incubare de 6 ore la 37°.

Prin adăugarea unei picături din soluția apoasă de clorură ferică 2%, înainte de adăugarea soluției de hidrat de potasiu, se accelerează efectuarea reacției, citirea putînd fi făcută după o oră de incubare la 37° (procedeul Werkman).

O metodă mai sensibilă și mai rapidă a fost recomandată de O'Meara, care la 5 ml cultură de examinat adaugă un vîrf de cuțit de creatină și apoi 5 ml soluție de hidroxid de sodiu 40%. După agitare 2—5 minute, reacția caracterizată prin apariția unei culori roz este vizibilă în 2 minute.

5. **Cultivarea în medii cu citrat.** Pentru a pune în evidență capacitatea germenilor de a folosi citratul de sodiu ca unică sursă de carbon, se utilizează următorul mediu sintetic, recomandat de către Simmons:

ClNa	5 g
Sulfat de magneziu	0,2 g
Fosfat monoamoniu	1 g
Fosfat bipotasic	1 g
Citrat de sodiu	2,77 g
Apă distilată	1 000 ml
Agar	20 g

Se dizolvă sărurile în apă, se adaugă agarul, se autoclavează la 100° timp de 20 de minute, se ajustează pH = 6,8. Ulterior se adaugă 4 ml din soluția alcoolică de albastru de bromtimol 4%. Se repartizează mediul în tuburi, se sterilizează la autoclav 20 de minute la 120°, după care tuburile sînt solidificate în poziție înclinată.

După însămînțarea tulpinii de cercetat pe suprafața mediului și incubare 24 de ore la 37°, în cazul cînd germenul are capacitatea de a folosi citratul ca unică sursă de carbon, cultura se dezvoltă, virînd în albastru culoarea mediului.

6. **Producerea de hidrogen sulfurat** (H_2S) în medii peptonate se cercetează în modul următor: se folosește mediu gelozat, la care s-a încorporat, după lichefiere prealabilă, acetat sau subacetat de plumb în soluție saturată (o picătură la 10 ml agar). După solidificarea mediului în coloană, se însămînțează tulpina de cercetat, prin înțepătură, în lungul peretelui tubului.

Înnegrirea mediului în lungul striei de însămînțare, după incubare 24 de ore la 37°, indică o reacție pozitivă.

O altă metodă de cercetare a producerii de hidrogen sulfurat este metoda cu benzi de hîrtie îmbibate în soluție saturată de acetat de plumb. Se taie benzi de hîrtie de filtru de circa 1 cm lățime și 3 cm lungime, care se îmbibă în soluția de acetat de plumb și se usucă apoi la termostat, în cutii Petri. În momentul însămînțării tulpinii în mediu lichid sau pe mediu solid, se anexează, prinsă în dop, hîrtia impregnată, astfel ca hîrtia să nu atingă mediul însămînțat.

Înnegrirea hîrtiei după incubare de 24 de ore la 37° indică o reacție pozitivă.

7. **Cercetarea lichefierii gelatinei** se efectuează însămînțînd cultura de cercetat, prin înțepătură, în mediu cu gelatină, solidificat în coloană. Mediul astfel însămînțat este incubat la 22°. Sub acțiunea fermenților proteolitici se observă lichefierea mediului. În lipsa termostatului de 22°, tuburile însămînțate pot fi incubate și la 37°, fiind ulterior răcite în apă rece.

Lipsa de solidificare a mediului, după răcire, arată lichefierea gelatinei sub acțiunea enzimei (gelatinază), elaborată de tulpina însămînțată.

Urmărirea procesului de lichefiere se face în cazurile negative timp de 90 de zile.

8. **Cercetarea capacității de reducere a nitraților în nitriți.** Se folosește mediul următor:

Peptonă	10 g
Nitrat de potasiu (lipsit de nitriți)	2 g
Apă distilată	1 000 ml

După dizolvarea ingredientelor, se filtrează prin hîrtie, se repartizează în tuburi cîte 10 ml şi se sterilizează la 100°, 30 de minute, timp de 3 zile consecutiv.

Tulpina de cercetat este însămînţată cu *ansa* dintr-o cultură de 18 ore pe agar 2% şi incubată 48 de ore la 37°.

Cercetarea nitriţilor din reducerea nitratului se efectuează cu ajutorul reactivului Ilosvay:

soluţia a:	Acid sulfanilic	0,5 g
	Acid acetic diluat 1/20	150 ml
soluţia b:	Apă distilată	22 ml
	α-naftilamină	1 g

La un tub de cultură se adaugă cîte 2 ml din soluţia *a* şi *b*.

Apariţia unei coloraţii roz arată prezenţa nitriţilor.

9. **Cercetarea producţiei de urează** se efectuează după una din următoarele metode:

a) *Metoda Blake-Christensen*, modificată de către M. Kristensen (recomandată de Kauffmann, în 1954).

Se foloseşte mediul de mai jos:

Bactopeptonă	1 g
ClNa	5 g
KH_2PO_4	2 g
Roşu fenol soluţie 1/500	6 ml
Apă distilată	1 000 ml

Se dizolvă ingredientele la fierbere. Se ajustează pH 6,8 — 6,9. Se autoclavează. Se adaugă în mod steril 1 g glucoză (sub formă de soluţie, sterilizată prin filtru Seitz), precum şi 20 g uree (sub formă de soluţie, de asemenea sterilizată prin filtru de asbest). Mediul este apoi repartizat, în mod steril în tuburi cîte 2 ml în fiecare, se păstrează la 37°, timp de 24 de ore, pentru controlul sterilităţii.

Tulpina de cercetat este însămînţată în mediul de mai sus, cîte o picătură din cultura în vîrstă de 24 de ore în bulion, după care tuburile sînt incubate la 37°, timp de 4 zile. Ca martor al mediului se însămînţează concomitent tuburi cu acelaşi mediu, lipsit de uree.

Citirea reacţiei se face zilnic.

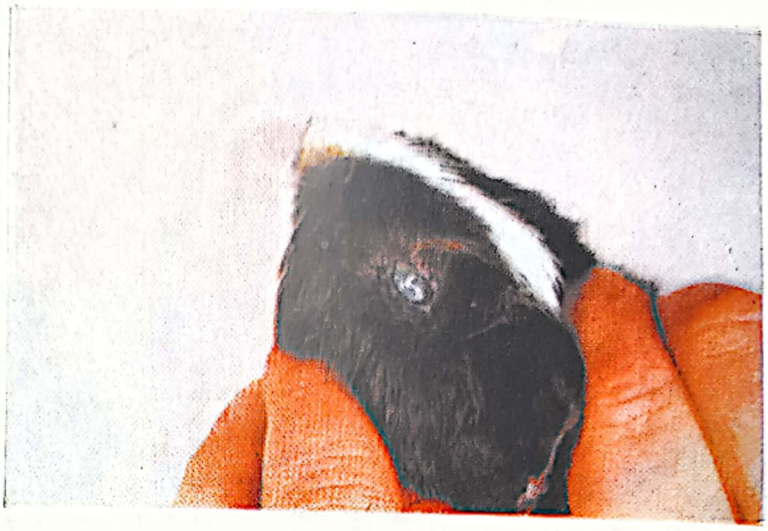
Apariţia unei culori roşii, indică o reacţie pozitivă.

b) *Metoda Ferguson şi Hook* (recomandată de Wilson şi Miles, 1957)

Uree	2 g
KH_2PO_4	0,1 g
K_2HPO_4	0,1 g
NaCl	0,5 g
Alcool etilic 95°	1 ml
Apă distilată	99 ml

Se ajustează pH = 7 şi mediul este sterilizat prin filtru Seitz. Se repartizează în mod steril în tuburi de hemoliză. Tulpina de cercetat este însămînţată în acest mediu. După incubare 24 de ore la 37°, se adaugă cîteva picături de albastru de bromtimol. Apariţia unei culori albastre intens indică hidroliza ureei, deci o reacţie pozitivă.

Fig. 98. — Testul kerato-conjunctivitei produs cu cultură de *Shigella*.



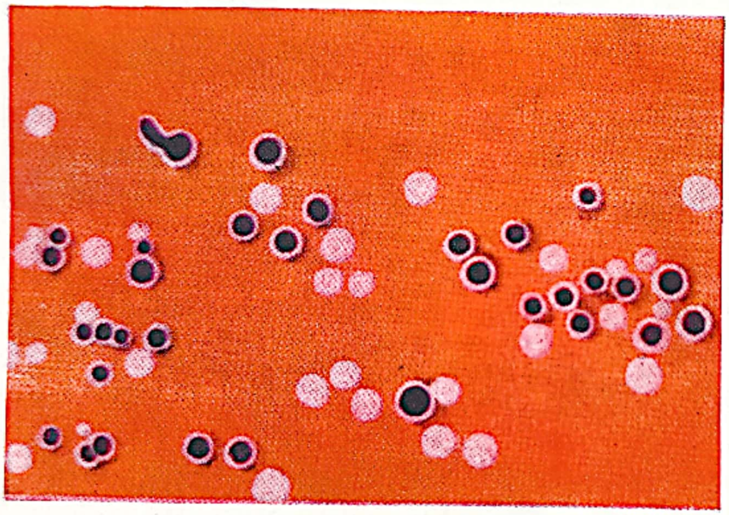


Fig. 99. — Mediul Levine : *Esch. coli* — colonii negricioase, cu luciu metalic ; *Salmonella* — colonii roz.

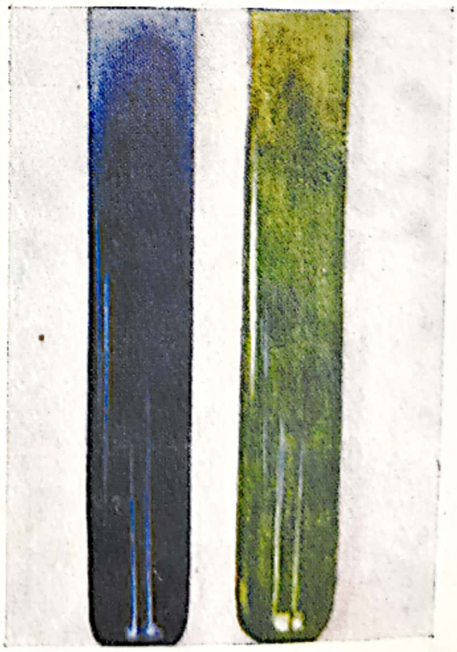


Fig. 100. — Cultivarea pe mediul Simmons : *Salmonella* crește și virează culoarea mediului în albastru ; *Escherichia* nu crește.

10. Comportarea față de KCN. a) *Testul Braun, formula originală* (Buttiaux și colaboratorii, 1952). Mediul folosit este următorul :

Peptonă	10 g
NaCl	5 g
Na_2HPO_4	5,637 g
KH_2PO_4	0,226 g
Agar	20 g
Apă distilată	1 000 ml

pH=7,4–7,6

După repartizare în tuburi 80 × 10 mm, în cantitate de 2,2 ml de fiecare tub, mediul este sterilizat prin autoclavare. Pentru a evita concentrarea mediului, dacă acesta nu este folosit imediat, tuburile se parafinează. În momentul întrebuințării se topește mediul la baia de apă, se răcește la 50° și se adaugă cu precizie 0,1 ml din soluția KCN 1/200.

După adăugarea soluției de cianură, tuburile sînt ținute cîteva minute la 45°, la baia de apă, pentru omogenizarea amestecului, după care sînt însămînțate cu 3 anse din cultura de cercetat, în vîrstă de 24 de ore, în apă peptonată. După însămînțare, tuburile sînt răcite brusc, sub apă de robinet, și apoi incubate, 24 de ore la 37°.

Germenii inhibați de KCN nu se dezvoltă, în timp ce acei insensibili la KCN se dezvoltă, formînd la suprafața mediului de cultură un inel alburiu, ușor vizibil.

b) *Testul KCN*, după V. Møller (1954)

Se folosește următorul mediu :

Peptonă Orthana	10 g
NaCl	5 g
KH_2PO_4	0,225 g
$Na_2HPO_4(2H_2O)$	5,64 g
Apă distilată	1 000 ml

Se ajustează pH 7,6. Se sterilizează prin autoclavare. La mediul răcit se adaugă 15 ml din soluția 0,5% KCN. Se repartizează apoi în mod steril cîte 1 ml mediu în tuburi 10 × 150 mm, care sînt apoi astupate cu dopuri de plută, sterilizate în prealabil în parafină topită. În aceste condiții mediul poate fi păstrat timp de 2 săptămîni la +4°.

Tulpina de cercetat este însămînțată în mediul de mai sus cu ansa din cultura de 24 de ore în, bulion. Concomitent se însămînțează tuburi martori, conținînd același mediu, dar fără KCN, precum și martori însămînțați cu culturi sigur KCN-pozitive și KCN-negative. Tuburile însămînțate sînt incubate la 37° timp de 4 zile, cu citire zilnică. Dezvoltarea culturii arată rezistență la acțiunea KCN (reacție pozitivă).

11. Cercetarea capacității de a fermenta acizii organici. Se folosește ca mediu de bază :

Lactopeptona (Difco)	10 g
NaOH N/10	8,5 g
Apă distilată	1 000 ml

Ca indicator se adaugă, la 1 000 ml mediu, 12 ml soluție de albastru de bromtimol 1/500.

La mediul conținînd indicator se adaugă unul din următorii acizi organici în soluții ajustate la pH = 7,4 cu NaOH N/5 :

— dextro-tartrat (tartrat de sodiu-potasiu, cristale purificate) în proporție de 1 % ;

— levo-tartrat (acid tartric) în proporție de 0,5 % ;

— meso-tartrat (acid tartric inactiv) în proporție de 0,5 % ;

— citrat de sodiu (citrat de sodiu neutru, în pulbere) în proporție de 1 % ;

— mucat (acid mucic) în proporție de 1 %.

Mediul + indicator + acizi organici se sterilizează prin autoclavare la 105°.

Tuburile cu mediu + indicator + acid organic sînt însămînțate cu ansa, din cultură în bulion în vîrstă de 20 de ore și incubate la 37°, citirea reacției fiind urmărită timp de 15 zile.

Aprecierea reacției se face, fie prin modificări de culoare, fie, în cazul *d*, *l*, *i*-tartrat și citrat, și prin aprecierea precipitatului apărut în urma adăugării unei cantități de 0,5 ml soluție saturată de acetat de plumb, la 3—4 ml cultură.

O reacție pozitivă este indicată de virarea culorii indicatorului de la albastru la verde-galben, cu apariția, în cazurile specificate, a unui precipitat minim la adăugarea acetatului de plumb. În cazul unei reacții negative, culoarea albastră inițială se menține, iar după adăugarea acetatului de plumb apare un precipitat voluminos.

12. **Cercetarea aminoaciddecarboxilazelor** — metoda Møller (1955). Se folosește următorul mediu de bază :

Peptonă Orthana (se poate folosi și proteose-peptonă)	5 g
Extract de carne	5 g
Bromcrezolpurpur-soluție 1/500	5 ml
Roșu de crezol soluție 1/500	2,5 ml
Piridoxal	5 mg
Glucoză	0,5 g
Apă	1 000 ml

Se ajustează la pH = 6.

La acest mediu de bază se adaugă, în proporția de 1%, diferiți aminoacizi corespunzători decarboxilazelor de cercetat.

Mediile conținînd aminoacizii sînt repartizate în tuburi de hemoliză, în coloană cam de 2 cm înălțime, sterilizate prin autoclavare și acoperite de un strat de ulei de parafină, sterilizat, de aproximativ 5 mm grosime.

Se folosesc de obicei următorii aminoacizi : lysină, arginină, ornitină și acid glutamic. Totdeauna se utilizează și martori pentru mediu, fără aminoacizi. În raport cu aminoacizii folosiți, tuburile sînt notate cu inițiale : L = lysină, A = arginină, O = ornitină, G = acid glutamic și C = control.

Culturi de 20 de ore pe geloză din tulpina de cercetat sînt însămînțate în mediile cu aminoacizi și incubate la 37°.

Tuburile care conțin acid glutamic sînt însămînțate în dublu exemplar, unul fiind incubat la 37° (G.37), iar celălalt la 25° (G. 25).

Tuburile L, A, O și C sînt citite zilnic. Schimbarea culorii indicatorului de la galben la violet indică o reacție pozitivă.

În mediile cu acid glutamic (G. 37 — G. 25), deoarece decarboxilarea acidului glutamic nu se poate efectua la pH 5—8, convenabil dezvoltării enterobacteriaceelor, ci la un pH mai acid, este necesar ca după dezvoltarea culturii de 24 de ore la 37° și 25° respectiv să se adauge 0,2 ml din soluție de acid clorhidric 0,25 N, agitînd energic și centrifugînd la turație mică, după care tuburile sînt din nou incubate (G. 37, pentru 48 de ore și G. 25, pentru 5 zile).

În acest timp enzima își poate exercita activitatea. Pentru citirea reacției se ridică pH cu NaOH (0,2 ml din soluție 0,25/N), se centrifughează din nou și se citește reacția în raport cu schimbarea de culoare.

13. **Cercetarea fenilalanindesaminazei.** Enzima transformă fenilalanina în acid fenilpiruvic. Testul descris de Henriksen (1950) și modificat de Ewing, Davis și Reavis (1957) folosește mediul următor:

Extract de drojdie	3 g
l-fenilalanină	1 g
ClNa	5 g
Na_2HPO_4	1 g
Agar	12 g
Apă distilată	1 000 ml

După dizolvarea substanțelor, mediul este repartizat în tuburi de hemoliză, sterilizat la 120°, timp de 20 minute și solidificat înclinat.

Tulpina de cercetat este însămînțată abundent pe suprafața mediului, cu incubare de 4—24 de ore la 37°. La culturile astfel obținute se adaugă 4—5 picături din soluție 10% clorură ferică, prelingînd reactivul pe suprafața culturii.

Apariția unei culori verzi indică o reacție pozitivă.

14. **Testul malonatului de sodiu.** Descris de Leifson în 1933, se bazează pe folosirea malonatului de către unele enterobacteriacee. Mediul folosit:

$(NH_4)_2SO_4$	2 g	1
K_2HPO_4	0,6 g	0,3
KH_2PO_4	0,4 g	0,2
ClNa	2 g	1
Malonat de sodiu	3 g	1,5
Extract de drojdie	1 g	0,5
Albastru de bromtimol, soluție alcoolică 0,5%	5 ml	
Apă distilată	1 000 ml	500

Se ajustează la pH = 7.

Mediul se distribuie în tuburi de hemoliză și se sterilizează timp de 10 minute la 120°.

Tulpina de cercetat este însămînțată și incubată timp de 16—20 de ore la 37°.

Schimbarea culorii mediului în albastru indică o reacție pozitivă; păstrarea culorii verzi indică o reacție negativă.

C. Cercetarea caracterelor serologice

Determinarea structurii antigenice a germenilor din familia enterobacteriaceelor (diferențierea serotipurilor) se efectuează cu ajutorul reacțiilor de aglutinare, folosind seruri aglutinante cunoscute, care sînt puse în contact *in vitro*, în anumite condiții, cu tulpina de cercetat.

Pe de altă parte, decelarea anticorpilor specifici în ser, în scop de diagnostic serologic, se efectuează, de regulă, tot cu ajutorul reacțiilor de aglutinare, folosind de această dată antigene cunoscute, care sînt puse în contact cu serul de cercetat.

H-
O-1
1-2

Prepararea antigenelor. Suspensiile antigenice „H" se prepară din culturi în bulion, în vîrstă de 8—24 de ore, formolate 4‰ cu formol 40%. Pentru exaltarea flagelilor și deci a antigenelor flagelare, se recomandă însămînțarea culturii respective de cîteva ori în bulion, la intervale de 6—8 ore, sau pe geloză moale 0,5%, distribuită în tub în U.

— Suspensiile antigenice „O", folosite pentru imunizarea iepurilor în vederea obținerii serurilor aglutinante, antisomatice, se prepară din culturi de forma „S" pe geloză, în vîrstă de 24 de ore, suspensionate în ser fiziologic și încălzite la 100° timp de $1-2\ ^1/_2$ ore.

Cele folosite pentru serodiagnostic se prepară tot din culturile „S" pe geloză, în vîrstă de 24 de ore, suspensionate în ser fiziologic, la densitate de 10 miliarde germeni pe ml și tratate cu alcool de 96°, la volum egal.

Suspensiile alcoolate sînt păstrate la 37° timp de 24 de ore și apoi la frigider, fiind diluate 1/10 în momentul întrebuințării.

Vi - V

— Suspensiile antigenice „K" se prepară în mod diferit, din culturi microbiene pe geloză, care sînt folosite, fie în stare vie, în cazul antigenelor foarte labile (antigene „Vi", „L" sau „B"), fie tratate cu formol (antigene „Vi", „L"), fie supuse acțiunii căldurii de 120°, în cazul antigenelor termostabile (antigene A).

Tehnicile privitoare la prepararea serurilor imune și la efectuarea reacțiilor de aglutinare și a altor reacții imunologice, folosite în cercetarea caracterelor serologice ale germenilor din familia enterobacteriaceelor, au fost expuse la capitolul „Imunitate dobîndită".

D. Determinarea tipului bacteriofagic (metoda lizotipiei)

Aceasta se efectuează cu ajutorul preparațiilor fagice specifice, folosite la diluția test (cea mai mare diluție de fag care produce liză confluentă față de tulpina omologă). Fagii necesari pentru practicarea lizotipiei *S. typhi*, *S. paratyphi B* și *S. typhimurium* sînt preparați în Laboratorul central de fagi enterici din Londra, care îi distribuie periodic, tuturor centrelor naționale de lizotipie din lume, în concentrații de 100 × diluția test, stare în care pot fi păstrați la frigider timp îndelungat. La intervale de 6 luni, se prepară diluții noi de fagi, la diluția test, care se păstrează de asemenea cu rigurozitate la frigider.

Tulpina de cercetat este cultivată în bulion (de preferință preparat cu extract de carne Lab-Lemco sau bulion Hottinger cu digestie triptică) la 37°, timp de 24 de ore. În ziua examinării se face subcultură în bulion, care este folosită în vîrstă de 2—3 ore de incubare, la 37°.

Pe suprafața unor plăci cu geloză (1,5—2% cu pH = 7,2—7,4), uscate și controlate, se însămînțează tulpina de cercetat, fie cu ansa, descriind atîtea arii cîte preparații de bacteriofag se folosesc în test, la care se adaugă o arie martor (metoda Craigie), fie prin răspîndirea culturii pe suprafața plăcii cu pipeta Pasteur, ridicînd apoi excesul (metoda Nicolle și colaboratorii).

Pe fundul plăcilor, trebuie desenate, în prealabil, ariile, cu indicațiile privind preparațiile de fag care se depun. După ce agarul a adsorbit cultura, în centrul fiecărei arii se depune, cu o ansă fină de platină (diametrul interior al buclei de 2,7 mm), ori cu pipeta Pasteur foarte efilată, cîte o picătură de fag.

După uscare, plăcile sînt incubate la 37°, cu citire la 5—6 ore în cazul *S. paratyphi B* și *S. typhimurium* și după 10—12 ore în cazul *S. typhi*.

Pentru notarea reacțiilor litice vezi capitolul ,,Bacteriofag''.

Interpretarea rezultatelor se efectuează în raport cu reacțiile litice pe care le prezintă tulpina respectivă și după indicațiile schemelor de lizotipie, corespunzătoare diferitelor specii microbiene, și care vor fi redate la capitolele respective.

Genul (grupul) Shigella

Germenii aparținînd acestui grup determină, din punct de vedere clinic, dizenteria bacilară, manifestată prin tenesme și scaune sanguinolente.

Definiție. Grupul *Shigella* este format din bacili imobili de 2—3 μ lungime, 0,5—0,7 μ grosime, necapsulați și nesporulați. Toți fermentează glucoza, iar unii fermentează manita; cu puține excepții, nici un reprezentant al grupului nu produce gaz prin fermentarea zaharurilor. Nu fermentează lactoza, în afară de *Sh. sonnei*, care o fermentează tardiv. Nu fermentează salicina, adonita și inulina, nu cresc pe mediul Simmons, nu fermentează ureea și nu lichefiază gelatina; nu produc hidrogen sulfurat și nu formează acetilmetilcarbinol.

Toți germenii aparținînd grupului *Shigella* posedă o structură antigenică după care pot fi identificați.

Istoric. Dizenteria este cunoscută din antichitate, însă etiologia sa a fost stabilită în a doua jumătate al secolului al XIX-lea și începutul secolului al XX-lea, începînd cu lucrările lui Chantemesse și Widal (1881), ale lui Grigoriev (1891), ale lui Celli și Fiocca (1895), aceștia din urmă punînd în evidență elaborarea de toxină la germenii izolați, precum și ale lui Shiga, care în 1898 izolează un germen aglutinat de către serul bolnavilor de disenterie.

La propunerea lui Troițki (U.R.S.S.), acest tip de bacil dizenteric a primit denumirea de B. Grigoriev-Shiga.

Cercetările lui Kruse (1900—1901) și ale lui Flexner (1901) au scos în evidență existența unei alte serii de germeni dizenterici, care inițial au fost denumiți bacili pseudodizenterici, diferiți de bacilul Grigoriev-Shiga. Tot în această grupă de bacili pseudodizenterici au fost introduși și germenii cunoscuți sub numele de *B. sonnei*. Acești germeni au fost descoperiți în Danemarca, în 1915. În fine, alt germen dizenteric a fost identificat în Romînia de către Schmitz, în 1917, pentru care i s-a dat numele de *B. schmitzi*.

Numărul mare de germeni dizenterici a impus o serie de clasificări biochimice, serologice și de patogenitate.

Aceste clasificări au suferit în decursul timpului un număr mare de modificări, cele mai multe din ele prezentînd astăzi doar un interes istoric.

În prezent, pe baza propunerilor Comisiei pentru *Shigella* a Subcomitetului internațional de Enterobacteriacee, făcute în 1950 și 1953, grupul *Shigella* este împărțit în 4 subgrupe — *A*, *B*, *C* și *D* — în interiorul cărora sînt cuprinse serotipuri înrudite din punct de vedere biochimic și antigenic.

Pentru a nu se crea confuzii cu diferite clasificări și denumiri mai vechi, care pot fi găsite în literatura de specialitate, redăm în tabelul XXV, XXVI și XXVII clasificarea internațională actuală și corespondența cu nomenclaturile anterioare.

Tabelul XXV

Subgrupa A (*Sh. dysenteriae*)

Clasificarea internațională (1950) tipul	Sachs, Wheeler și alții	Ewing Madsen	Troițki (1953)	Alte denumiri
Sh. dysenteriae tipul 1	*Sh. shigae*	I. *Sh. shigae*	b. Grigoriev-Shiga	b. Shiga-Kruse
Sh. dysenteriae tipul 2	*Sh. schmitzi*	II. *Sh. schmitzi*	b. Stuzer-Schmitz	*Sh. ambigua*
Sh. dysenteriae tipul 3	Q 771	III. *Sh. largei-sachsii* tip 2	—	—
Sh. dysenteriae tipul 4	Q 1 167	IV. *Sh. largei-sachsii* tip 5	—	—
Sh. dysenteriae tipul 5	Q 1 030	V. *Sh. largei-sachsii* tip 4	—	—
Sh. dysenteriae tipul 6	Q 454	VI. *Sh. largei-sachsii* tip 1	—	—
Sh. dysenteriae tipul 7	Q 902	VII. *Sh. largei-sachsii* tip 3	—	—

Tabelul XXVI

Subgrupa B (*Sh. flexneri*)

Clasificarea internațională (și Madsen)		Nomenclatura engleză	Kruse	Boyd și Ewing	Wheeler	Weil și colaboratorii	Troițki	Alte denumiri
Tipul	Subtipul							
Sh. flexneri 1	1 a	V(Andrews-Inman)	BC	I	I b	I	f	—
,, ,, 1	1 b	VZ ,, ,,	A	I	I a	I.III	—	—
,, ,, 2	2 a	W ,, ,,	D	II	II a	II.	cb	B. Hiss
,, ,, 2	2 b	WX ,, ,,	—	II	II b	II.VII	—	—
,, ,, 3	—	Z ,, ,,	H	III	III	III	e	—
,, ,, 4	4 a	103 (Boyd)	F	IV	IV b	IV	—	—
,, ,, 4	4 b	—	—	IV	IV a	III.IV	—	—
,, ,, 5	—	P 119 (Boyd)	G	V	V	V	—	B. Strong
,, ,, 6	—	P 88 (Boyd)	L	VI	VI	VI	B. Newcastle	B. Newcastle
Varianta X	—	X (Andrews-Inman)	X	X	X	VII	—	—
,, Y	—	Y ,, ,,	Y	Y	Y	VIII	—	—

Tabelul XXVII

Subgrupa C (*Sh. boydii*)

Clasificarea internațională și Madsen	Boyd 1938	Boyd 1940-1946	Ewing	Weil	Wheeler	Troițki	Alte denumiri
Sh. boydii tip 1	170	I	I	IX	VII	Boyd-Novgorodskaia I	—
,, ,, ,, 2	P 288	II	II	X	VIII	,, ,, V	—
,, ,, ,, 3	D 1	III	III	XI	X	—	—
,, ,, ,, 4	P 274	IV	IV	XIV	IX	,, ,, III	B. Kruse
,, ,, ,, 5	P 143	V	V	XIII	XII	,, ,, VII	—
,, ,, ,, 6	D 19	VI	VI	XII	XI	—	—
,, ,, ,, 7		VII	VII	—	—	—	B. Kruse Levingston S. etousae
,, ,, ,, 8							Sero-tip 112
,, ,, ,, 9							Sero-tip 1296/7
,, ,, ,, 10							Sero-tip 430
,, ,, ,, 11							Sero-tip 34

Tabelul XXVIII

Subgrupa D *(Sh. sonnei)*

Clasificare internațională	Alte denumiri	Troițki	Kruse
Tipul *Sh. sonnei*	*B. ceylonensis* *B. Sonne-Duval* *A. Castellani*	*B. sonnei*	E

Legenda: — = lipsesc analogii.

Observație. În clasificarea sovietică (Troițki) există, în plus, o serie de tipuri locale de *Sh. flexneri* tipurile a,b,d și de b. Boyd-Novgorodskaia tipurile II, IV și VI.

Habitat. Germenii din grupul *Shigella* sînt întîlniți în scaunele bolnavilor de dizenterie, cu formă acută și cronică, precum și la purtătorii aparent sănătoși. Acești germeni pot fi izolați mai greu din mediul extern, ape poluate, muște, alimente contaminate.

Caractere morfologice. Germenii din acest grup au formă de bacil, cu o lungime de 2—3 μ și grosime de 0,5—0,7 μ. Sînt imobili, cu excepția *Sh. flexneri*, tip 6, la care s-au descris și variante mobile.

Nu prezintă capsulă și nici spori.

În culturi vechi, prezintă un polimorfism accentuat. Sînt Gram-negativi.

Caractere de cultură. Cresc ușor pe medii uzuale de cultură.

Medii lichide: cultivate în bulion, formele „S" tulbură uniform mediul, formele „R" sedimentează. Cultura în apă peptonată prezintă aceleași caractere.

Medii solide: pe geloză formele „S" dezvoltă colonii mici, rotunde, translucide, cu suprafața netedă și margini regulate. Acest aspect se observă la izolarea din scaun și la primele treceri pe medii de cultură. În subculturi, coloniile devin mai mari, mate și opace. Formele „R" dezvoltă colonii cu margini neregulate, uscate, turtite și zbîrcite. Ele sînt întîlnite la culturile vechi, precum şi la *Sh. sonnei*, forma „R". Sînt observate şi forme intermediare „R" — „S". Cultivate pe plăci de gelatină, produc colonii de aspect asemănător celui de pe agar.

Caractere biochimice şi de metabolism. Aerobi şi anaerobi facultativ, aceşti germeni cresc în condiţii optime la 37°. *Sh. sonnei* se dezvoltă în limite mai largi de temperatură (+10 — +45°, testul Eijkman). Sensibili la variaţii de pH, se dezvoltă bine la neutralitate.

Necesităţile nutritive sînt diferite : s-au descris tulpini autotrofe capabile să folosească amoniacul ca singură sursă de azot şi glucoza ca unică sursă de carbon, pe lîngă tulpini heterotrofe, care necesită factori de creştere ca : vitamine din grupul B şi triptofan.

După cum s-a arătat la definiţia grupului, germenii din grupul *Shigella* nu formează H_2S, nu desfac ureea, nu cresc pe mediul Simmons, formează uneori catalază. Szturm-Rubinstein (1960), cercetînd activitatea catalazică pe lamă a diferitelor *Shigella*, a arătat că *Sh. sonnei* în faza I şi *Sh. flexneri* au o catalază foarte activă, în opoziţie cu *Shigella* din subgrupa A care posedă o activitate catalazică slabă. Unele tulpini dau reacţia roşu de metil pozitivă şi reacţia Voges-Proskauer negativă. Reduc nitraţii în nitriţi.

Fermentează glucoza fără producere de gaz (excepţie unele tulpini de *Sh. flexneri*, tip 6). Nici un reprezentant al grupului nu fermentează adonita, salicina şi inozita. În genere nu fermentează lactoza (excepţie *Sh. sonnei*, care fermentează tardiv).

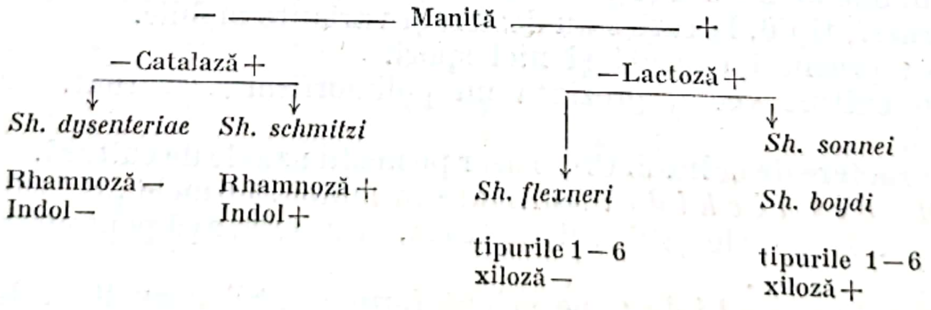
După cum fermentează sau nu manita, germenii din grupul *Shigella* pot fi împărţiţi în două mari subgrupe biochimice :

— Grupul manito-negativ (subgrupa A din clasificarea internaţională).

— Grupul manito-pozitiv (subgrupele B, C, şi D), cu excepţia unor tulpini aparţinînd serotipurilor de *Sh. flexneri* 4 şi 6).

Un test biochimic important de diferenţiere a germenilor din subgrupa A îl constituie fermentarea rhamnozei ; pe cînd *Sh. schmitzi* fermentează acest zahăr, *Sh. shigae* nu-l fermentează. Pe de altă parte, germenii din subgrupa B atacă în mod variabil rhamnoza, pe cînd cei din subgrupa D sînt constant rhamnozo-pozitivi.

Pe baza fermentării manitei, rhamnozei şi xilozei, precum şi a elaborării de catalază şi producerii de indol, Topley (1957) redă următoarea schemă de diferenţiere biochimică :



Germenii din grupul *Shigella* nu acţionează asupra gelatinei şi a serului coagulat. Nu reduc roşul neutru.

Redăm în tabelul XXIX reacţiile biochimice ale germenilor din grupul *Shigella*.

Rezistența la agenți fizici, chimici și biologici. În afara organismului germenii din grupul *Shigella* sînt puțin rezistenți, însă la întuneric și temperatură convenabilă pot supraviețui pînă la 40 de zile. În scaune nu trăiesc decît cîteva ore.

În produse alimentare (lapte, produse lactate), în ape poluate, supraviețuiesc cîteva zile.

Tabelul XXIX

Reacțiile biochimice ale germenilor din grupul *Shigella* (după Edwards-Eving)

Tipuri sau specii		Glucoză	Lactoză	Zaharoză	Maltoză	Manitol	Dulcitol	Rhamnoză	Arabinoză	Xiloză	Sorbitol	Indol
Sh. dysenteriae	1	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—
	2	A	0	0	(V)	0	0	A	0	0	(A)	+
	3	A	0	0	(A)	0	0	0	A(A)	0	A(A)	—
	4	A	0	0	(A)	0	0	0	(V)	0	(V)	—
	5	A	0	0	0	0	(A)	0	(A)	0	A(A)	—
	6	A	0	0	0	0	0	0	A	0	0	—
	7	A	0	0	(A)	0	0	(A)	A	0	0	+
Sh. flexneri	1	A	0	0	(V)	A	0	(V)	A	0	0	+
	2	A	0	0	(V)	A	0	(V)	A	0	0	+
	3	A	0	0	(V)	A	0	(V)	A	0	A	+
	4	A	0	0	(V)	A	0	(V)	V	(V)	0	+
	5	A	0	0	(V)	A	0	(V)	V	0	0	+
	6	A	0	0	(V)	V	V	0	A	0	0	—
	7	A	0	0	(V)	V	V	0	A	0	0	—
Sh. boydii	1	A	0	0	V	A	0	0	A	V	(A)	—
	2	A	0	0	V	A	V	0	A	V	0	—
	3	A	0	0	0	A	(A)	0	A	A	(A)	—
	4	A	0	0	V	A	0	0	A	A	0	—
	5	A	0	0	0	A	0	0	(A)	(A)	A	+
	6	A	0	0	0	A	(A)	0	A	(A)	A	—
	7	A	0	0	(V)	A	0	0	0	A	V	+
	8X	A	0	0	A	A	0	0	A	(A)	A	—
Sh. sonnei		A	(A)	(A)	A	A	0	A	A	0	0	—

Legendă: A și Ag= acid, sau acid și gaz în 24 de ore;
(A)=fermentare întîrziată (48 de ore sau mai mult);
V=variabil
(V)=variabil cînd fermentarea este întîrziată
X=tip provizoriu

În apă infectată experimental (sterilizată în prealabil) durata de supraviețuire este mai lungă, ajungînd pînă la 12—14 zile. În gheață, unde flora concurentă este redusă, trăiesc pînă la 2 luni.

La temperatura de 58—60° mor în 10 minute.

Fenolul 1% îi omoară în 30 de minute, iar sublimatul 0,5% îi distruge în cîteva secunde.

Sînt sensibili la acțiunea sulfamidelor și antibioticelor (cloramfenicol, streptomicină, aureomicină etc.); nu sînt sensibili la penicilină.

Sînt sensibili la bacteriofagi specifici.

Structura antigenică. Fiind germeni imobili, deci lipsiți de aparat ciliar, structura lor antigenică este constituită numai din antigene somatice „O”, de natură glucido-lipido-polipeptidică.

În timp ce germenii din grupele *A* și *C* sînt omogeni din punct de vedere antigenic, cei din grupa *B* sînt heterogeni, avînd, în afară de antigenul specific de tip (antigenul principal), și o serie de fracțiuni antigenice „O”, de grup.

Cum o serie de tulpini de *Shigella* sînt inaglutinabile față de serurile anti-„O” pure, se consideră că aceste tulpini posedă antigene de înveliș. Madsen a demonstrat existența antigenului „K” la *Sh. flexneri* tip 6 și la diferite serotipuri de *Sh. largei sachsii* și *Sh. boydii.*

Tabelul XXX

Tipul (Wheeler)	Nomenclatura internațională	Antigenul de tip	Antigene pe grupe
I a	1 b	I	1 2 4 5 6 9
I b	1 a	I	1 2 4 5 9
II a	2 a	II	1 3 4
II b	2 b	II	1 7 8 9
III	3	III	1 6 7 8 9
IV a	4 b	IV	1 6
IV b	4 a	IV	1 3 4
V	5	V	1 5 7 9
VI	6	VI	1 3 4
X	var X	—	1 7 8 9
Y	„ Y	—	1 3 4

Pentru identificarea tipurilor în interiorul subgrupului *B*, care, după cum am arătat mai sus, se caracterizează printr-o heterogenitate accentuată, Wheeler a alcătuit o schemă privind structura antigenică a germenilor din acest grup (vezi tabelul XXX).

În subgrupa *D* (*Sh. sonnei*), în raport cu formele de cultură „S” și „R”, se constată de asemenea diferențe de structură antigenică. Wheeler și Mickle consideră formele „S” și „R” ca două faze I și II ale *Sh. sonnei*, imunologic distincte. Boivin și L. Mesrobeanu au arătat că numai antigenul somatic al formelor „S” (faza I) conține antigenul glucido- lipidic specific; formele „R” au un antigen somatic mai redus.

O schemă antigenică provizorie, mai completă, este redată în articolul lui Slopek din monografia *Enterobacteriaceae* Infektionen (Sedlak și Rische, 1961). Redăm în tabelul XXXI această schemă.

Caractere de patogenitate. Germenii din grupul *Shigella* posedă caractere diferite de patogenitate.

Sh. shigae se caracterizează printr-un complex de produse toxice reprezentate prin exo- și endotoxine; forma „S” elaborează o exotoxină de natură proteică, neurotropă, termolabilă. Van Heynigen și Gladstone (1953) au obținut o toxină purificată conținînd 750 DL_{50} pentru șoarece și 150 000 DL_{50} pentru iepure pe miligram. Prin cromatografie au stabilit componența în aminoacizi a toxinei, precum și caracteristicele fizicochimice ale ei. Pe de altă parte, *Sh. shigae* conține și o endotoxină de natură glucido-lipidică, enterotropă și termostabilă (Boivin și Mesrobeanu, Calalb). Forma „R” de *Sh. shigae* nu conține decît endotoxină.

Tabelul XXXI

Proprietățile serologice ale shigelelor

Subgrupe	Tip	Structura antigenică		Denumiri anterioare		
		Antigen O	Antigen K			
A *Sh. dysenteriae*	1	I	A 1	*Sh. shigae*		
	2	II	A 2	*Sh. schmitzii* grupa Large-Sachs		
	3	III	A 3	Q 771		
	4	IV	A 4	Q 1167		
	5	V	A 5	Q 1036		
	6	VI	A 6	Q 454		
	7	VII	A 7	Q 902		
	8	VIII	A 8	Serotip 599/52		
	9	IX	A 58	Serotip 58/48		
	10	X	.	Serotip 2050/52		
	.	.	.	Serotip 3873/56		
B *Sh. flexneri*				+	++	+++
	1 a	I :4		BC	V	d
	1 b	I :4, 6		A	VZ	f
	2 a	II :4	B 2a	D	W	c
	2 b	II :7		.	WX	.
	3 a	III :6, 7		H	Z	e
	3 b	III :4,6,7		.	.	.
	3 c	III :6		.	.	.
	4 a	IV :4		F	Boyd 103	.
	4 b	IV :6		.	.	.
	5	V :7		G	Boyd P 119	.
	6	VI :4	B 6	L	Boyd 88	Newcastle
	X	— :7		X	X	b
	Y	— :4		Y_1	Y_2 Y	a
C *Sh. boydii*	1	I	C 1	Boyd 170		
	2	II	C 2	Boyd P 288		
	3	III	C 3	Boyd D_1		
	4	IV	C 4	Boyd 274		
	5	V	C 5	Boyd P 143		
	6	VI	C 6	Boyd D 19		
	7	VII	C 7	Lavington I, Etousa		
	8	VIII	C 8	Serotip 112		
	9	IX	C 9	Serotip 1296/7		
	10	X	C 10	Serotip 430		
	11	XI	C 11	Serotip 34		
	12	XII		Serotip 123		
	13	XIII	C 425	Serotip 425		
	14	XIV		Serotip 2770/56		
	15	XV	C 703	Serotip 703		
D *Sh. sonnei*		Faza I Faza II		Sonne-III Kruse Tip E *Sh. ceylonensis* A		

Explicații :
+) germană
++) engleză
+++) sovietică
} Denumiri

În 1938, Istrati a demonstrat că exotoxina *Sh. shigae* nu este exclusiv neurotropă, după cum nici endotoxina nu este exclusiv enterotropă, atît exo- cît şi endotoxina avînd proprietăţi neuro- şi enterotoxice.

Pe de altă parte, Istrati a pus în evidenţă la forma „R" de *Sh. shigae*, în culturile pe geloză de 24 de ore tratate cu cloroform, un alt factor toxic, deosebit de antigenul glucido-lipidic şi polizaharidul specific, care floculează în prezenţa serului antidizenteric, putînd servi la titrarea acestuia.

Morgan a extras din *Sh. shigae*, cu ajutorul formamidei, o fracţiune antigenică de natură polizaharidică şi polipeptidică care, inoculată la iepure, provoacă apariţia de aglutinine şi precipitine specifice.

Cu excepţia parţială a *Sh. schmitzi*, toxicitatea ridicată a *Sh. shigae* nu are egal printre ceilalţi bacili dizenterici.

Sh. schmitzi este variabil ca toxicitate, deşi Buchwald i-a descris o neurotoxină termolabilă.

Germenii aparţinînd subgrupelor *B*, *C* şi *D*, forma „S", nu conţin decît endotoxine. Aceste endotoxine identificate cu însuşi antigenul somatic de constituţie glucido-lipido-polipeptidică, manifestă un grad de toxicitate destul de redus, avînd mai ales o acţiune enterotropă. Boeke (1946), folosind tehnica Boivin, a raportat totuşi obţinerea la *Sh. sonnei*, alături de endotoxină, a unei exotoxine neurotrope, care însă era de 100—500 de ori mai slabă decît exotoxina *Sh. shigae*. Formele „R", cu un antigen somatic degradat, sînt în general lipsite de toxicitate.

Boala la om. După o incubaţie de 2—8 zile, boala începe brusc, cu frison, febră, colici abdominale şi scaune diareice însoţite de tenesme.

În raport cu caracterele de patogenitate ale agentului cauzal, scaunele pot fi de la 6 pînă la 10 pe zi (subgrupele *B*, *C*, *D*) sau de la 40 pînă la 100 pe zi (*Sh. shigae*). Scaunul se caracterizează prin aspect muco-sanguinolent sau muco-purulent.

În perioada de stare a bolii, se instalează aspecte de intoxicaţie gravă, cu tulburări circulatorii şi nervoase, dureri articulare şi tendinoase, în care starea de deshidratare poate fi maximă.

Fenomenele clinice se amendează în cîteva zile (2—4 zile) sub acţiunea tratamentului cu sulfamide şi antibiotice. Fără tratament, boala poate dura 1—2 săptămîni. Scaunele se răresc, capătă aspect fecaloid, starea generală îmbunătăţindu-se.

Alteori boala trece la cronicitate, bolnavii devenind amelioraţi, cu scaune diareice alternînd cu constipaţie, stare care poate dura ani de zile.

Din punct de vedere anatomopatologic, boala se caracterizează printr-o hiperemie şi edem al mucoasei intestinului gros, în care sînt prezente ulceraţii superficiale.

În dizenteria cronică, intestinul gros prezintă o îngroşare în totalitatea lui, mucoasa arătînd sufuziuni sanguine sau depozite muco-membranoase.

Privitor la mecanismul de infecţie în dizenterie, au fost emise mai multe teorii. După Sanarelli, germenii introduşi în organism pe cale bucală ar trece prin aparatul limfatic al cavităţii bucale şi faringiene în torentul circulator, de unde ar ajunge în intestinul gros, unde provoacă leziuni, avînd un organotropism marcat pentru peretele intestinal.

După Semeran, germenii trec prin stomac şi pătrund în torentul circulator la nivelul intestinului subţire, fiind eliminaţi apoi prin intestinul gros.

După alţi autori, patogenia dizenteriei ar fi legată şi de un fenomen alergic, de tipul fenomenului Schwartzman.

Cît priveşte exotoxina *Sh. shigae*, ea ar determina o creştere a permeabilităţii pereţilor capilarelor în creier, ficat, inimă, plămîn, modificările capilarelor intestinale fiind produse, nu sub acţiunea directă toxinelor, ci prin intermediul centrilor nervoşi, care ar da naştere unui reflex periferic cu acţiune asupra capilarelor intestinale.

Boala spontană la animale. Cu excepţia maimuţelor captive şi a cîinilor, care poartă uneori în intestin *Sh. flexneri*, animalele nu par a suferi spontan de dizenterie.

Infecţia experimentală. Nu este posibilă reproducerea bolii tipice a omului, prin administrarea experimentală pe cale parenterală sau *per os* la animalele de laborator, cu excepţia maimuţelor.

În raport cu tipurile de bacili dizenterici, infecţia experimentală capătă aspecte variate.

Inocularea intravenoasă la iepure de culturi vii de *Sh. shigae* produce moartea animalului în 1—4 zile, cu fenomene diareice şi paralizii ale trenului posterior, datorite neurotoxinei (Van Heyningen şi Gladstone). Cu doze mici se obţin ulceraţii, necroză şi eliminarea germenilor la nivelul intestinului. Infecţia experimentală cu *Sh. flexneri* şi *Sh. sonnei* nu este atît de severă.

Inocularea la şoarece a culturilor vii sau toxină de *Sh. shigae* pe cale intraperitoneală sau subcutanată determină moartea animalului în 1—4 zile, cu paralizia trenului posterior. *Sh. flexneri* şi *Sh. sonnei* omoară numai în doze mari.

Cobaiul este mai puţin sensibil decît iepurele şi şoarecele.

În ultimii ani acest animal este mult folosit pentru studiul patogenităţii germenilor din grupul *Shigella* prin testul keratoconjunctivitei descris de către Serreny (1955). Keratoconjunctivita produsă cu culturi vii de *Shigella*, proaspăt izolate, introduse în sacul conjunctival, se caracterizează prin manifestări clinice care apar după o incubaţie de 1—5 zile, avînd durată de 14—21 de zile şi terminîndu-se de obicei prin rezoluţie *ad integrum*. Numai rareori se produce generalizarea infecţiei şi moartea animalului.

Tulpinile de *Shigella* care au activitate catalazică puternică provoacă manifestări oculare mult mai precoce, decît cele lipsite de această activitate.

Imunitate. Problema existenţei unei imunităţi dobîndite este complicată de heterogenitatea antigenului somatic al germenilor din subgrupul *Sh. flexneri*, cel mai frecvent întîlnit dintre speciile de *Shigella*.

Unii cercetători sînt de părere că infecţia clinică conferă un oarecare grad de protecţie faţă de afecţiuni ulterioare cu o tulpină omologă (Hary şi Watt).

Protecţia încrucişată nu pare însă să existe.

Pe de altă parte, apariţia şi evoluţia diferită a bolii la grupe variate de vîrstă sugerează un oarecare grad de imunitate dobîndită, specifică.

Problema factorilor cu potențial de inducere a imunității este încă controversată. În cazul *Sh. disenteriae* exotoxina proteică pare a fi unul din factori, fiind capabilă să stimuleze producerea de antitoxină și poate, și imunitate împotriva bacililor înșiși. Al doilea factor este reprezentat prin antigenul somatic „O", a cărui capacitate de a stimula putere protectoare a fost demonstrată la șoareci. Asupra valorii lui protectoare față de infecția spontană la om problema este discutată. Dificultatea în interpretarea datelor experimentale asupra capacității imunizante a diferitelor antigene de *Shigella* se datorește lipsei unui animal de laborator cu receptivitate similară cu aceea a omului, precum și administrării antigenelor pe căi nenaturale.

Studiind infecția dizenterică la om, nu s-a putut găsi vreo legătură între prezența sau absența anticorpilor umorali și apariția infecției.

Pe de altă parte, s-a observat o apariție mai timpurie a anticorpilor produși de antigenele somatice în materiile fecale decît în sînge și chiar unele diferențe calitative (Barksdale și Ghoda).

Imunitatea specifică s-ar putea baza, în acest caz, mai ales pe răspunsul în anticorpii enterici (imunitate locală), capabili să acționeze îndeosebi prin acțiune opsonizantă. În cazul speciilor exotoxice, anticorpii neutralizanți ar contribui și ei la efectul protector (Raffel, 1953).

Tratament specific. Pînă la folosirea sulfamidelor și antibioticelor, în tratamentul dizenteriei bacilare a fost întrebuințat, cu bune rezultate, serul antidizenteric antitoxic și antimicrobian, polivalent, anti-Shiga și anti-Flexner.

Fagoterapia nu a dat rezultate.

Diagnosticul de laborator

Este un diagnostic bacteriologic prin excelență, bazat pe izolarea germenilor din produsele patologice și identificarea lor.

Produsele de examinat. Dată fiind localizarea shigelelor la nivelul mucoasei intestinului gros, produsele de examinat sînt materiile fecale recoltate de la bolnavi cu forme acute de dizenterie, bolnavi cronici și foști bolnavi.

În cazul toxiinfecțiilor alimentare, pe lîngă materiile fecale de la bolnavi, contacți, personal mînuitor de alimente, se recoltează și probe din alimentele incriminate, ca vehicul al infecției.

Condiții de recoltare. Produsele de examinat sînt recoltate în recipiente sterile si ermetic închise.

Recoltarea materiilor fecale de la bolnavi în faza acută se face din scaunul ca atare.

La bolnavi cronici, bolnavi cu forme atipice sau purtători, în lipsa scaunelor diareice, recoltarea se poate face, fie cu sonda Nélaton nr. 16—18, fie cu tampon sau cu tubul Zieman.

Rezultate foarte bune se obțin prin recoltarea materialului sub control rectoscopic (Popkova și Cerepnina, 1944, raportează rezultate pozitive în 90% din cazuri, chiar în dizenteria cronică).

În cazul cînd probele pot fi însămînțate imediat, produsele sînt recoltate ca atare. Dacă însămînțarea se face la oarecare interval de timp, se recomandă folosirea unui mediu conservant.

Redăm mai jos formula unui asemenea mediu:

Glicerină	300 ml	Fosfat monopotasic	1 g sau
Apă distilată	700 ml	Fosfat monosodic	6,24 g
Clorură de sodiu	4,2 g	Fosfat dipotasic	3,1 g sau
		Fosfat disodic	12,6 g

Se aduce la pH 7,2 cu soluție de hidrat de sodiu 5—10%.

Se repartizează în recoltoare cîte 3—5 ml din mediul astfel preparat și se sterilizează la autoclav 30 de minute, la 110°.

Însămînțarea și izolarea germenilor. Dacă în perioada acută de boală cînd bacilii dizenterici domină flora intestinală, diagnosticul este ușor, germenii dezvoltîndu-se și pe medii diferențiale, simple, cum este de pildă mediul Drigalski sau geloza lactozată, conținînd ca indicator albastrul de bromtimol, la sfîrșitul bolii, în formele cronice și la purtători, cînd flora saprofită este mai abundentă, izolarea devine mai dificilă și necesită folosirea mediilor selective, menite să inhibeze creșterea germenilor de asociație.

S-au recomandat un număr mare de medii complexe și de modificări ale acestor medii. Unele substanțe s-au dovedit îndeosebi favorabile dezvoltării shigelelor, exercitînd în același timp un efect bacteriostatic asupra germenilor saprofiți. Printre acestea sînt în primul rînd sărurile biliare, citratul de sodiu, citratul de fier, hiposulfitul de sodiu.

Cum shigelele s-au arătat sensibile la acțiunea verdelui briliant, acest bacteriostatic, atît de folosit la prepararea mediilor de îmbogățire și selective pentru izolarea salmonelelor, trebuie evitat în cazul mediilor selective pentru izolarea shigelelor.

Pentru izolarea germenilor patogeni intestinali, Leifson (1935) a recomandat mediul cu agar-dezoxicolat-citrat, cunoscut și sub numele de mediul Leifson.

Formula mediului *Leifson*, modificat după Tomasoffova, Kiesewalter și Sedlak, este următoarea:

Mediul constă dintr-un agar de bază adăugat la 4 soluții diferite:

Agar de bază

Bulion de carne	350 ml
Peptonă	5 g
Agar	20 g
Apă	650 ml

Se corectează pH 7,3. Se precipită, se filtrează prin vată. Se sterilizează timp de 30 de minute la autoclav.

Soluția 1

Natrium citricum $Na_3C_6H_5O_7+2H_2O$	17 g
Natrium tiosulfat $Na_2S_2O_3-5H_2O$	17 g
Ferrum citricum cryst. $FeC_6H_5O_7+5H_2O$	2 g
Apă	100 ml

După dizolvare, se fierbe timp de 3 minute la flacără.

Soluția 2

Dezoxicolat de Na	10 g
Apă	100 ml

Se fierbe puțin.

Soluția 3

Lactoză	20 g
Apă	100 ml

Sterilizare 3 fiole, timp de 15 minute, la 100°.

Soluția 4

Roșu neutru	1 g
Apă distilată sterilizată.	100 ml

Prepararea mediului:

Agar de bază	1 000 ml	200
Soluția 1	50 ml	10
Soluția 2	50 ml	10
Soluția 3	50 ml	10
Soluția 4	3 ml	0,6

Se sterilizează timp de 15 minute în autoclavul deschis (100°), se toarnă în plăci.

Mediul are o culoare roz.

Salmonelele și shigelele dezvoltă colonii transparente, *Esch. coli* — colonii roșii, iar *B. proteus* — colonii mate, uneori cu centrul închis (H_2S pozitiv).

Un alt mediu recomandat pentru izolarea shigelelor este mediul S—S (*Salmonella-Shigella*), a cărui formulă este următoarea:

Extract de carne	5 g	Citrat feric	1 g
Peptonă Difco	5 g	Geloză	17,5 g
Lactoză	10 g	Citrat de sodiu	8,5 g
Săruri biliare (săruri nr. 3 Difco)	8,5 g	Verde briliant	0,00033 g
		Roșu neutru	0,025 g
Hiposulfit de sodiu	8,5 g	Apă distilată	1 000 ml

Aspectul coloniilor este același ca pe mediul Leifson.

Folosind principiul mediului Leifson, Istrati și Meitert au recomandat *mediul cu bilă uscată*, a cărui formulă este următoarea:

Geloză 3% pH 7,8	100 ml	Citrat de sodiu cristalizat sau pulbere	0,8 g
Lactoză	1,5 g	Hiposulfit de sodiu cristalizat	0,8 g
Bilă uscată de bou[1]	0,8 g	Citrat de fier în lamele	0,2 g

Se topește geloza la baia de apă și se adaugă ingredientele în ordinea indicată.

După dizolvare, se adaugă 4 ml soluție de albastru de bromtimol, preparată în modul următor:

Albastru de bromtimol	1 g
Soluție de hidrat de sodiu n/10	25 ml
Apă distilată sterilă	475 ml

---

[1] Prepararea bilei uscată: se lasă bila de bou (recoltată de la mai multe animale) spre sedimentare 24 de ore, după care se întinde în tăvi smălțuite, în strat de 2—3 cm grosime. Se usucă la temperatura de 60°. Se ridică bila uscată și se triturează în mojar.

Se corectează pH la 7,3–7,4 (culoare verde închis), folosind o soluție de hidrat de sodiu 5–10%.

Se fierbe mediul 15 minute la baia de apă, iar după scăderea temperaturii la 60°, se toarnă în plăci Petri.

Mediul este de culoare verde închis și poate fi păstrat la ghețar 2–3 zile de la preparare.

Pe mediul Istrati-Meitert, coloniile aparținînd germenilor din grupul *Shigella* apar verzi sau verzi-albăstrui, relativ transparente, în timp ce acelea de *Esch. coli* sînt galbene, opace; *B. proteus* se dezvoltă sub formă de colonii izolate, cu centrul mai opac, care devine ulterior negru („ochi de pisică").

Tehnica de însămînțare. Cînd produsele de însămînțat conțin mucozități sanguinolente, acestea sînt luate cu ansa și spălate într-o cutie Petri, care conține 5–10 ml ser fiziologic. Ulterior mucozitatea este întinsă pe suprafața mediului, astfel ca să se obțină colonii izolate (dacă mucozitățile au fost păstrate în soluție conservantă, nu mai este nevoie să fie spălate).

Dacă în proba de cercetat nu se găsesc mucozități, se omogenizează scaunul în soluție conservantă și se iau două anse cu bucla de 5–6mm diametru, care sînt întinse pe suprafața mediului în diametrul plăcii, la o distanță de 2 cm una de alta. Cu aceeași ansă se trag striuri perpendiculare pe diametrul plăcii, pentru răspîndirea germenilor și obținerea coloniilor izolate. Coloniile suspecte de *Shigella* sînt repicate pe alte plăci cu bilă, fiecare din ele pe cîte un sector separat. După incubarea plăcilor la 37°, din culturile obținute, se procedează la studiul microscopic pe frotiuri colorate prin metoda Gram și la identificarea serologică.

Balș și Leonescu au folosit pentru diagnosticul dizenteriei testul keratoconjunctivitei Serreny, în modul următor: se însămînțează abundent produsul patologic pe mediul cu bilă. După incubare de 18–20 de ore la 37°, se ridică cu ansa o cantitate mare din cultura obținută și se introduce în sacul conjunctival al ochiului de cobai. Însămînțarea secreției obținute dezvoltă culturi pure de *Shigella* în 40,1% din cazuri (prin metoda obișnuită de izolare procentul de coproculturi pozitive a fost numai de 21,7).

Identificarea serologică se efectuează în primul timp prin aglutinări pe lamă, folosind următoarele seruri aglutinante: anti-*Sh. flexneri* polivalent, anti-*Sh. sonnei* „S", anti-*Sh. sonnei* „R", anti-*Sh. shigae*, anti-*Sh. schmitzi*, anti-*Sh. largei sachsii* polivalent, anti-*Sh. boydii* polivalent.

Serurile se folosesc la diluțiile indicate pe fiolă.

Identificările pe lamă sînt completate cu reacții de aglutinare, în tub, față de serurile care au produs rezultate pozitive pe lamă. Reacțiile de aglutinare în tub se efectuează punînd în contact diluțiile de ser, pînă la epuizarea titrului, cu cultura de cercetat.

Citirea reacțiilor se face după incubare 2 ore la 52°, sau 4 ore la 37° și 20 de ore la temperatura camerei.

Pentru determinarea tipurilor serologice în cazul germenilor din subgrupul *Sh. flexneri* este necesar să se folosească seruri adsorbite, tipizarea serologică efectuîndu-se prin reacţii de aglutinare pe lamă. În acest scop se folosesc seruri de tip (I ; II ; III ; K IV$_1$; V şi VI) şi seruri de grup (6 ; 3, 4 ; 7 ; 8, 9).

În cazul germenilor aparţinînd subgrupurilor *Sh. boydii* şi *Sh. largei-sachsii*, se folosesc seruri specifice de tip.

În scopul unei diferenţieri în interiorul tipurilor serologice s-au făcut încercări de tipizare prin bacteriofagi la subgrupul *Sh. sonnei* (Hammarström) şi la subgrupul *Sh. flexneri* (Istrati, 1960).

Datorită faptului că deseori tulpini de *Esch. coli* sau *Paracolobactrum* pot aglutina în titru foarte ridicat cu serurile antidizenterice (fie din cauza aglutininelor naturale din serul de iepure şi mai ales de cal, fie din pricina unor fracţiuni antigenice comune), este necesar ca diagnosticul unei tulpini de *Shigella* să se facă totdeauna, atît pe baza reacţiilor serologice, cît şi a celor biochimice.

Tabelul XXXII

	Sh. shigae	Sh. schmitzi	Sh. flexneri	Sh. sonnei
Lactoză	—	—	—	+ (tardiv 2—8 zile)
Manită	—	—	+(—)	+
Rhamnoză	—	+	—(+)	+
Indol	—	+	+	—

Pentru a înlătura erorile datorite prezenţei aglutininelor naturale din ser, Istrati şi colaboratorii au propus, în asemenea cazuri, folosirea, alături de serul aglutinant de diagnostic, a unei probe din acelaşi ser, adsorbit cu culturi de *Esch. coli* şi paracoli, precum şi a unui ser „negativ" (din care au fost îndepărtate, prin adsorbţie, aglutininele antidizenterice).

Identificările serologice trebuie completate prin studiul mobilităţii şi cercetarea unor caracteristici biochimice, care permit şi ele diferenţieri, paralel cu subgrupele serologice. În practica curentă se cercetează caracterele fermentative asupra lactozei, manitei şi rhamnozei, precum şi producerea de indol, folosind schema minimală de diagnostic (vezi tabelul XXXII).

Citirea reacţiilor se face după 18—20 de ore de incubare la 37°, reacţiile negative fiind urmărite zilnic, timp de 20 de zile.

Examenul probelor de alimente se efectuează după o tehnică similară cu cea expusă mai sus.

Diagnosticul serologic, bazat pe cercetarea anticorpilor aglutinanţi în ser, oferă indicaţii reduse, dată fiind evoluţia foarte scurtă a bolii, iar pe de altă parte faptul că aglutininele naturale, prezente în titru destul de ridicat, pot să creeze dificultăţi de interpretare.

În formele cronice, prelungite, dinamica evoluţiei anticorpilor oferă posibilitatea unui diagnostic retrospectiv (Istrati şi colaboratorii, 1955).

Tehnica reacţiei: diluţii din serul de cercetat sînt puse în contact cu culturi formolate 0,1—0,2%. Citirea reacţiei se face după incubare 24 de ore la 37°.

Titrul diagnostic admis este de 1/100 pentru *Sh. shigae*, 1/200 pentru *Sh. flexneri*.

Cercetătorii sovietici Prutman, Benderskaia, Stepanovskaia şi Rainerman au arătat că reacţia de aglutinare are valoare diagnostică numai de la titrul 1/200 pentru copii şi 1/400 pentru adulţi.

Epidemiologie

Ca urmare a folosirii pe scară largă a sulfamidelor şi antibioticelor, se observă în toată lumea o scădere a incidenţei *Sh. shigae* şi trecerea pe primul plan a dizenteriei determinate de *Sh. flexneri*, *Sh. sonnei* şi *Sh. boydii*. În ţara noastră predomină subgrupul *Sh. flexneri* (subtipurile 1a, 1b, 2a, 2b, 3 etc., dintre care subtipul *Sh. flexneri* 2a deţine, el singur, 65–69%). Au fost întîlnite în afară de *Sh. sonnei*, a cărei prezenţă este în continuă creştere, şi tulpini de *Sh. largei-sachsii* şi *Sh. boydii*.

Dizenteria bacilară afectează mai ales grupele de vîrstă 0–5 ani şi peste 60 de ani. În aceste grupe de vîrstă se constată totodată forme clinice mai severe şi o mortalitate mai ridicată.

Boala cunoaşte o incidenţă sezonieră ridicată (vară, toamnă), deşi sînt semnalate şi epidemii de iarnă (Nestorescu şi colaboratorii).

Izvorul de infecţie este reprezentat de : bolnavul de dizenterie acută sau cronică, purtătorul de germeni de scurtă durată şi purtătorul sănătos imun ; principalul izvor de infecţie îl constituie însă bolnavii cu forme atipice de boală şi cei cu dizenterie cronică.

Factorii clasici de transmitere a dizenteriei bacilare, ca : felul de viaţă, alimentele şi apa de băut, au un rol bine determinat în răspîndirea acestei boli. Factorul hidric, altădată puţin luat în considerare, capătă un rol din ce în ce mai important în apariţia izbucnirilor epidemice, indiferent de anotimp.

Dizenteria de origine hidrică evoluează adeseori atipic din punct de vedere clinic, după tipul gastroenteritelor şi toxiinfecţiilor alimentare, avînd drept caracteristică afectarea de predilecţie a populaţiei adulte şi a copiilor mari.

Factorul economico-social este deosebit de important în scăderea incidenţei dizenteriei bacilare. Pe măsură ce standardul de viaţă al oamenilor se ridică, pe aceeaşi măsură scade incidenţa acestei boli.

Ridicarea stării imunobiologice cu ajutorul vaccinurilor nu este încă rezolvată.

În această direcţie s-a lucrat foarte mult în ultimii 50 de ani. Vaccinuri corpusculare, extracte microbiene, toxoizi au fost rînd pe rînd folosiţi cu rezultate contradictorii.

Testul epidemiologic al vaccinărilor specifice, efectuate la noi sau în alte ţări, nu a oferit rezultate concludente.

În ţara noastră, încă din 1942, Istrati, Nestorescu şi colaboratorii au preparat un vaccin polivalent anti-*Shiga* şi antigrup Flexner, conţinînd exotoxină proteică de *Sh. shigae* şi endotoxină şi corpi bacilari de *Sh. shigae* şi *Sh. flexneri*, pe care l-au experimentat, obţinînd titruri ridicate antitoxice şi antimicrobiene în serul vaccinaţilor.

Se pare că succesul unei vaccinări eficace s-ar putea obţine numai cu vaccinuri vii atenuate (Istrati).

Genul (grupul) Escherichia

Escherichia coli şi infecţiile colibacilare

Germenii aparţinînd acestui grup sînt microorganisme comensale, constituenţi obişnuiţi ai florei normale a corpului, care însă, în anumite condiţii,pot deveni patogeni pentru om şi animale.

Definiţie. Sînt bacili, mobili nesporulaţi, gram-negativi. Fermentează lactoza (cu rare excepţii), produc indol, dau reacţia roşu de metil pozitivă, nu descompun ureea şi nu folosesc citratul ca unică sursă de carbon.

Istoric. În 1895, Escherich a pus în evidenţă în scaunele adulţilor, două tipuri de germeni pe care i-a denumit *B. coli communis* şi *B. lactis aerogenes*. Primele caracteristici biochimice au fost descrise de către Chantemesse şi Widal, în 1887 şi 1891.

După o serie de cercetări asupra factorilor antigenici ai germenilor din grupul coliformilor, efectuate mai ales de către Smith (1928) şi Lovell (1937), Kauffmann (1944), Knipschildt şi Vahlne (1945), au pus în evidenţă complexitatea lor antigenică, elaborînd chiar o schemă antigenică de diagnostic.

Esch. coli a fost izolat dintr-o serie întreagă de infecţii, printre care infecţii urinare, septicemii, endocardite maligne, iar în ultima vreme o serie de cercetători, începînd cu Adam (1923), Taylor (1947), Giles şi colaboratorii (1949), Kauffmann şi Dupont (1949) etc., au identificat anumite tipuri serologice de *Esch. coli* în etiologia diareei maligne a nou-născuţilor sau sindromul toxico-septic epidemic.

Habitat. Întîlniţi în mod normal în conţinutul intestinal al omului şi animalelor, este răspîndit pretutindeni în mediul extern, în aer, apă, sol etc. În intestinul omului, *Esch. coli* pare să joace un rol însemnat în sinteza unor vitamine din grupul B (Gant, 1942).

Caractere morfologice. Se prezintă sub forma unor bastonaşe de dimensiuni variabile între 2 şi 3μ lungime şi 0,4 şi 0,6 μ grosime. Arată însă un polimorfism accentuat, apărînd uneori cu forme filamentoase pînă la 8 μ lungime după cum poate fi găsit în forme scurte, chiar cocoide. Sînt mobili, prezintă însă o mobilitate mai redusă decît salmonelele. Au cili mai puţin numeroşi şi mai puţin lungi.

Există şi variante puţin mobile sau chiar imobile. Sînt nesporulaţi şi în genere lipsiţi de capsulă. S-au descris însă şi variante incapsulate. Sînt Gram-negativi.

Caractere de cultură. Puţin pretenţioşi, cresc pe medii obişnuite de cultură.

Însămînţaţi în bulion tulbură uniform mediul, cu formare tardivă a unui depozit care se disperseazǎ uşor. În culturi vechi se poate observa un inel aderent la peretele tubului şi mai rar peliculă. Formele „R" dezvoltă culturi sedimentate, care lasă deasupra mediul clar.

În apă peptonată, culturile au acelaşi aspect.

Pe geloză, formele „S" dezvoltă colonii rotunde, bombate, opace cu margini regulate, pe cînd formele „R" prezintă colonii uscate, turtite, aderente la mediu, cu margini dinţate. Dimensiunile coloniilor sînt variabile cu diametrul ajungînd pînă la 2—3 mm.

În anumite condiții, sau sub acțiunea unor agenți biologici, ca antibiotice și bacteriofag, pot apărea pe geloză colonii mucoase, uleioase (Ciucă, 1920), vitroase etc. Pe mediul cu cartof dezvoltă culturi ușor pigmentate.

Caractere biochimice și de metabolism. Aerobi și facultativ anaerobi, sînt ușor adaptabili la variații largi de temperatură și reacție chimică, dezvoltîndu-se în condiții optime la 37° și pH 7,2—7,6.

Capabili de o intensă activitatea enzimatică, germenii din grupul *Escherichia* merg pînă la limita autotrofismului.

În afară de proprietățile biochimice enunțate în însăși definiția grupului, *Esch. coli* acidifică și coagulează laptele și elaborează, în unele cazuri, o hemolizină activă pentru hematiile de cal și cîine (colilizine).

Tabelul XXXIII

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Adonitol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Dulcitol	—	+2	+1.2	+1.2	+1.2	+2	+2.3	—	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinoză	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xiloză	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnoză	+	+	X	+	+	+	X	+	+	+
Maltoză	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicină	+2	+2.3	—	+1.2	+1.2	+2.3	—	+1.2	+3	+2
Inozitol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lactoză	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucroză	—	—	—	—	—	—	+	—	+	X
Manitol	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Glucoză	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Indol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H_2S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Gelatină	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Amoniu glucoză	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amoniu citrat	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
KNO_2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reacția Voges-Proskauer	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Roșu de metil	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Uree	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
d-tartrat	—14	X	+ 8	+ 8	—14	—14	+ 8	+ 8	—14	14
l-tartrat	—14	—14	—14	—14	—14	—14	—14	—14	—14	—14
Sodiu citrat	—14	X	—14	X	—14	X	+14	—14	—14	—14
Mucat	+15	—14	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1

Legendă: 1—10 sînt tulpinile test ale grupelor „O" 1—10.

Nu lichefiază gelatina, nu produce acetilmetilcarbinol (reacția Voges-Proskauer negativă), nu produce hidrogen sulfurat.

Pe baza reacțiilor de fermentare a unui număr de zaharuri ca și a altor reacții biochimice, s-au putut stabili mai multe tipuri biochimice.

Redăm în tabelul XXXIII caracteristicele tipurilor biochimice de *Esch. coli* (Kauffmann, 1954).

Unele tulpini de *Esch. coli* sînt capabile să elaboreze anumite substanțe cu acțiune antagonistă (colicine).

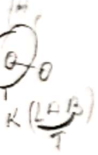
Rezistența la agenți fizici, chimici și biologici. *Esch. coli* supraviețuiește în mediul extern (sol, apă etc.) timp îndelungat (luni de zile). Supuși la acțiunea căldurii, germenii sînt omorîți la 55° într-o oră și la 60° în 15—20 de minute.

Sînt sensibili la acțiunea antisepticelor uzuale: fenol, sublimat, cloramină etc. Clorul în concentrație de 0,5-1/1000 000, s-a dovedit un bactericid puternic, fiind folosit la purificarea apei.

Sînt sensibili la acțiunea coloranților din grupul trifenilmetanului (verde briliant, verde malahit). Cafeina, clorura de litiu, sărurile de seleniu, teluritul de potasiu, tetrationatul, în concentrații diferite, au acțiune bacteriostatică selectivă, ceea ce justifică folosirea lor în prepararea mediilor speciale. Sînt sensibili la concentrații ridicate de sulfamide. Față de substanțele antibiotice, *Esch. coli* se comportă în mod variat. Sînt rezistenți la penicilină, datorită elaborării de penicilinază. Antibioticele extrase din diferite specii de *Streptomyces* sînt în genere active (streptomicină, cloramfenicol, aureomicină etc.).

Sînt sensibili la acțiunea bacteriofagilor, sub acțiunea cărora pot apărea diferite variante, însoțite sau nu de lizogenitate. Încă din 1920, Bordet și Ciucă au descris varianta „Coli M” lizogenă, cu caracter uleios, obținută din coli „Brx” lizosensibil, supus acțiunii bacteriofagului anticoli.

Structura antigenică. *Esch. coli* prezintă o heterogenitate antigenică foarte marcată, datorită prezenței multiplelor fracțiuni antigenice flagelare și somatice, ca și a variatelor antigene de înveliș sau capsulare.



Antigenul somatic „O” este termostabil, rezistînd $2\ ^{1}/_{2}$ ore la 100°. Nu este distrus de alcool, formol și acid clorhidric. Din punct de vedere chimic, este de natură glucido-lipido-polipeptidică. S-au descris pînă în 1964 un număr de 147 fracțiuni antigenice „O”.

Antigenul flagelar „H” este termolabil, rezistent la acțiunea formolului și inhibat de alcool în activitatea sa aglutinantă și capacitatea sa de adsorbție. Față de acidul clorhidric arată o sensibilitate marcată. Ca constituție chimică, este de natură proteică. Au fost identificate 49 fracțiuni antigenice „H” (1964).

Antigenul „K” este de fapt, reprezentat prin 3 factori antigenici deosebiți, care de obicei nu coexistă la aceeași tulpină de *Esch. coli* (Ørskov a întîlnit totuși două tulpini de *Esch. coli* care aveau simultan antigen L și B). Este vorba de antigenele „L”, A”, „B”. Aceste antigene se comportă diferit față de agenții fizici și chimici. Se cunosc 89 de antigene K (1964).

Antigenul „L” este un antigen somatic de înveliș, termolabil; este distrus complet prin încălzire 60 de minute la 100°. De asemenea alcoolul și acidul clorhidric îl distrug. Fiind așezat la suprafața corpului bacterian, determină „O”-inaglutinabilitatea germenului. Conferă tulpinilor care îl posedă o patogenitate marcată. Tulpinile de *Esch. coli* care au antigen „L” sînt adesea hemolitice și necrotice. Inoculat la animale, stimulează producerea de anticorpi „L”, care au rol protector.

Antigenul „A”. Este întîlnit la formele capsulate de *Esch. coli*. Tulpinile care posedă antigen „A” dezvoltă colonii voluminoase, albicioase, opace care amintesc coloniile mucoase.

Prezența capsulei poate fi pusă în evidență cu ajutorul fenomenului Neufeld.

Antigenul „A” este puternic termostabil, neputînd fi distrus decît după expunere la 120° timp de 2 ore. Este distrus de alcool, dar rezistă la formol și acid clorhidric. Ca și antigenul „L”, determină „O”-inaglutinabilitatea tulpinilor care-l posedă. De asemenea conferă o rezistență pronunțată la bacterioliză, fagocitoză și bacteriofag.

Tulpinile de *Esch. coli* care posedă antigen „A” manifestă, cu toate acestea, o patogenitate redusă, fiind nehemolitice și doar slab necrotice.

Antigenul „B” este relativ termolabil. Prin încălzire la 100° își pierde aglutinabilitatea, în timp ce proprietatea antigenică și cea de adsorbție rămîn nealterate. Tulpinile cu antigen „B” rezistă, atît la alcool, cît și la formol și acid clorhidric.

Antigenul „B” produce de asemenea „O”-inaglutinabilitatea tulpinilor de *Esch. coli*.

Deși tulpinile care posedă antigen B nu sînt hemolitice și necrotice, ele s-au dovedit foarte patogene pentru nou-născuți și sugari, cărora le pot determina un sindrom toxicoseptic cunoscut și sub numele de diareea malignă a nou-născuților.

Dacă cele trei categorii de antigene cunoscute azi la E. coli—O,K și H—s-ar combina în variatele lor posibilități, am putea considera ipotetic că, în natură ar exista cel puțin 500 000 de serotipuri de E. coli.

În ultima vreme au fost descrise tulpini de Esch. coli care prezintă antigen „Vi”. Landy, Webster și Sagin, folosind metode de extragere cu ajutorul etanolului și hidroliza cu acid acetic, au putut purifica acest antigen. Antigenul „Vi” descris la *Esch. coli* este asemănător dar nu identic cu antigenul „Vi” prezent la unele specii de Salmonella.

Referitor la capacitatea de imunogeneză, antigenul „Vi”, prezent la *Esch. coli*, pare să fie cu mult mai activ decît cel prezent la Salmonella. Astăzi se admite ca tulpinele de E. coli cu antigen „Vi” să fie clasate numai în genul *Citrobacter*.

Redăm în tabelul XXXIV caracteristicile antigenelor prezente la *Esch. coli*.

Pe baza prezenței antigenelor „O”, „H” și „K”, Kauffmann, Knipschildt și Vahlne au formulat o schemă antigenică de diagnostic. S-au descris pînă în prezent foarte numeroase tipuri serologice de *Esch. coli*, însă cele mai importante, din punct de vedere al relațiilor cu patologia umană, sînt cele prevăzute în primele 25 de grupe „O”.

Prezentăm, în tabelul XXXVI schema antigenică de diagnostic elaborată de Kauffmann, Knipschildt și Vahlne.

În acord cu recomandările Subcomitetului internațional pentru Enterobacteriacee, antigenele „L”, „B” și „A” pot fi indicate în schema antigenică de diagnostic cu simbolul „K” însoțit de un exponent numeric (cifră arabă).

În afară de grupele serologice „O” 1-25, s-au descris o serie de tipuri serologice prevăzute cu diferite fracțiuni antigenice „B”, incriminate în etiologia diareei maligne a nou-născuților. Redăm în tabelul nr. XXXIV schema antigenică a tulpinelor de *Esch. coli* incriminate în etiologia acestui sindrom (Sedlak și Rische, 1961).

Prezența capsulei poate fi pusă în evidență cu ajutorul fenomenului Neufeld.

Antigenul „A” este puternic termostabil, neputînd fi distrus decît după expunere la 120° timp de 2 ore. Este distrus de alcool, dar rezistă la formol și acid clorhidric. Ca și antigenul „L”, determină „O”-inaglutinabilitatea tulpinilor care-l posedă. De asemenea conferă o rezistență pronunțată la bacterioliză, fagocitoză și bacteriofag.

Tulpinile de *Esch. coli* care posedă antigen „A” manifestă, cu toate acestea, o patogenitate redusă, fiind nehemolitice și doar slab necrotice.

Antigenul „B” este relativ termolabil. Prin încălzire la 100° își pierde aglutinabilitatea, în timp ce proprietatea antigenică și cea de adsorbție rămîn nealterate. Tulpinile cu antigen „B” rezistă, atît la alcool, cît și la formol și acid clorhidric.

Antigenul „B” produce de asemenea „O”-inaglutinabilitatea tulpinilor de *Esch. coli*.

Deși tulpinile care posedă antigen B nu sînt hemolitice și necrotice, ele s-au dovedit foarte patogene pentru nou-născuți și sugari, cărora le pot determina un sindrom toxicoseptic cunoscut și sub numele de diareea malignă a nou-născuților.

Dacă cele trei categorii de antigene cunoscute azi la E. coli—O,K și H—s-ar combina în variatele lor posibilități, am putea considera ipotetic că, în natură ar exista cel puțin 500 000 de serotipuri de E. coli.

În ultima vreme au fost descrise tulpini de Esch. coli care prezintă antigen „Vi”. Landy, Webster și Sagin, folosind metode de extragere cu ajutorul etanolului și hidroliza cu acid acetic, au putut purifica acest antigen. Antigenul „Vi” descris la *Esch. coli* este asemănător dar nu identic cu antigenul „Vi” prezent la unele specii de Salmonella.

Referitor la capacitatea de imunogeneză, antigenul „Vi”, prezent la *Esch. coli*, pare să fie cu mult mai activ decît cel prezent la Salmonella. Astăzi se admite ca tulpinele de E. coli cu antigen „Vi” să fie clasate numai în genul *Citrobacter*.

Redăm în tabelul XXXIV caracteristicile antigenelor prezente la *Esch. coli*.

Pe baza prezenței antigenelor „O”, „H” și „K”, Kauffmann, Knipschildt și Vahlne au formulat o schemă antigenică de diagnostic. S-au descris pînă în prezent foarte numeroase tipuri serologice de *Esch. coli*, însă cele mai importante, din punct de vedere al relațiilor cu patologia umană, sînt cele prevăzute în primele 25 de grupe „O”.

Prezentăm, în tabelul XXXVI schema antigenică de diagnostic elaborată de Kauffmann, Knipschildt și Vahlne.

În acord cu recomandările Subcomitetului internațional pentru Enterobacteriacee, antigenele „L”, „B” și „A” pot fi indicate în schema antigenică de diagnostic cu simbolul „K” însoțit de un exponent numeric (cifră arabă).

În afară de grupele serologice „O” 1-25, s-au descris o serie de tipuri serologice prevăzute cu diferite fracțiuni antigenice „B”, incriminate în etiologia diareei maligne a nou-născuților. Redăm în tabelul nr. XXXIV schema antigenică a tulpinelor de *Esch. coli* incriminate în etiologia acestui sindrom (Sedlak și Rische, 1961).

Caractere de patogenitate. Patogenitatea *Esch.coli* s-a dovedit legată mai ales de prezența antigenului „K". Majoritatea tulpinilor de *Esch. coli*, izolate din diferite produse patologice, în opoziție cu tulpinile izolate din intestinul oamenilor sănătoși, posedă antigen „K".

Tabelul XXXIV

Schema antigenică a speciilor de *Esch. coli* enteropatogeni

(J. Sedlak, H. Rische — Enterobacteriaceae-Infektionen 1961)

Vechea nomenclatură O : K : H	Noua nomenclatură O : K : H
O25 : 11L : H(6)	O25 : K : 11(L) : H6
O25 : 3L :	O25 : K3(L) :
O26 : B6 : H(11)	O26 : K60(B) : H11
O26 : B6 : H32	O26 : K60(B) : H32
O27 : . : .	
O44 : 74L : H12	O44 : K74(L) : H12
O44 : 74L : H(18)	O44 :K74(L) : H18
O55 : B5 : H(6)	O55 : K59(B) : H6
O55 : B5 : H2	O55 : K59(B) : H2
O55 : B5 : H4	O55 : K59(B) : H4
O55 : B5 : H7	O55 : K59(B) : H7
O55+ : B5 : H8+	O55+ : K59(B) : H8+
O55+ :B5 : H10±	O55+ : K59(B) : H10+
O55 : B5 : H11	O55 : K59(B) : H11
O55 : B5 : H21	O55 : K59(B) : H21
O55 : B5 : H27	O55 : K59(B) : H27
O55 : B5 : H32	O55 :K59(B) : H32
O86 : B7 : H(34)	O86 : K61(B) : H34
O86 : 62L : H2	
O111 : B4 : H(2)	O111 : K58(B) : H2
O111 : B4 : H(12)	O111 : K58(B) : H12
O111 : B4 : H4	O111 : K58(B) : H4
O111+ : B4 : H11	O111+ : K58(B) : H11
O111 : B4 : H21	O111 : K58(B) : H21
O114 : . : H2	
O114 : . : H32	O114 : ? : H32
O114 : . : H10	
O114 : . : ?	
O119 : B14 : H6	O119 : K69 (B) : H6
O119 : B14 : H27	O119 : K69(B) : H27
O125 : B15 : H19	O125 : K70(B) : H19
O126 : Bk6 : H2	O126 : K71(B) : H2
O127 : B8 :.	O127 :K63(B) : .
O128 : B12 : H2	O128 : K67(B) : H2
O128 : Bk2 : H(2)	O128 : K67(B) : H2
O128 : B12 : H8	O128 : K67(B) : H8
O128 : B12 : H9	O128 : K67(B) : H9
O128 : B12 : H10	O128 : K67(B) : H10
O128 : B12 : H12	O128 : K67(B) : H12

Virulența *Esch. coli* este redusă; sînt rare cazurile clinice în care caracterul de invazivitate al germenilor este prezent.

În schimb, au fost descrise toxine colibacilare. Unele din ele, exotoxina colibacilară termolabilă, posedă acțiune neurotoxică, putînd provoca la animalele de laborator leziuni de mielită acută cu amiotrofie intensă (Vincent). De asemenea, s-au descris și endotoxine cu manifestări diferite. După natura chimică și manifestările de patogenitate s-au descris: o endotoxină de natură proteică, relativ termolabilă (endotoxina solubilă), care provoacă enterita hemoragică (enterotoxina Vincent), precum şi leziuni viscerale, mai ales la nivelul capsulei suprarenale (viscerotoxina Magheru), şi o endotoxină de natură glucido-lipidică insolubilă termostabilă, care provoacă enterita acută la cobai şi şoarece, dacă este administrată pe cale intravenoasă.

Tulpinile de *Esch. coli* pot fi hemolitice şi necrotice. Activitatea hemolitică este mai intensă pentru hematiile de cal, iar acţiunea necrotică poate fi pusă în evidenţă prin inoculare intradermică la iepure. S-au descris şi tulpini care determină aglutinabilitatea hematiilor.

McNaught (1958) şi Taylor (1958 şi 1961), folosind metoda ansei ligaturate de intestin de iepure a lui De şi Chatterje, au pus în evidenţă caracterele de patogenitate *in vivo* ale tulpinilor de *Esch.coli*, cu antigen „B". În ţara noastră, A. Filloti a confirmat relaţiile de patogenitate ale acestor tulpini particulare de *Esch. coli*, cu aspectele morfolezionale ale intestinului ligaturat de iepure.

Boala la om. Comensal obişnuit *Esch. coli* se găseşte în mod constant în tractul intestinal al omului şi al animalelor, unde apare încă din primele ore după naştere. În mod obişnuit se pot găsi concomitent mai multe tipuri serologice, unele persistînd intervale scurte de timp (tipuri tranzitorii), altele timp îndelungat, uneori chiar ani de zile (tipuri rezidente). În anumite condiţii însă, *Esch. coli* poate dovedi o capacitate marcată de patogenitate, cînd poate determina infecţii urinare variate ca intensitate şi localizare (cistite, pielite, pielo-nefrite etc.), infecţii intestinale (enterite, colite, enterocolite), infecţii periintestinale sau perirectale, peritonite, apendicite. Pătrunzînd în torentul circulator, poate cauza infecţii generalizate—septicemii—cu localizări secundare în organe, plămîn, endocard, căi biliare şi chiar la nivelul meningelor (localizare semnalată mai ales la sugari).

În ultima vreme s-a atras atenţia asupra rolului anumitor tipuri serologice de *Esch. coli* în etiologia sindromului toxicoseptic epidemic sau diareea malignă nou-născuţilor. Boala este caracterizată printr-o simptomatologie axată mai ales pe tubul digestiv, însoţită de o stare de deshidratare şi o masivă pierdere în greutate. Acest sindrom, care interesează nou-născuţii în primele zile de viaţă, îmbracă uneori un aspect de o deosebită gravitate, atingînd o mortalitate pînă la 50 şi chiar 80% (Braun).

Dintre numeroasele ipoteze care s-au elaborat asupra etiologiei sindromului toxico-septic epidemic (natură virotică, diferite specii microbiene) singura care se bazează pe probe experimentale la om şi animal este aceea care susţine rolul etiologic al anumitor tipuri serologice de *Esch. coli*. Începînd cu lucrările lui Jensen (1903), care a izolat anumite tulpini patogene din diareea viţeilor nou-născuţi, o serie de cercetători, ca Adam, Bray, Taylor şi colaboratorii, Giles şi colaboratorii au descris diferite tulpini de *Esch. coli* din enterite epidemice ale nou-născuţilor. O dată cu dezvoltarea cunoştinţelor asupra structurii antigenice a germenilor din grupul *Escherichia*, s-a observat că numai anumite tipuri serologice, conţinînd diferite fracţii antigenice „B", sînt întîlnite în etiologia acestui sindrom. Astfel, în 1950, Kauffmann şi Dupont au izolat şi identificat tipurile $O_{111}B_4$ şi $O_{55}B_5$, Ørskov tipul $O_{26}B_6$ şi ulterior s-au mai descris serotipurile $O_{127}B_8$, $O_{86}B_7$, $O_{119}B_{14}$, $O_{125}B_{15}$ (Canioni), $O_{126}B_{16}$ etc.

La noi în ţară M. Ciucă, N. Nestorescu, M. Popovici şi colaboratorii, şi ulterior şi alţi autori au pus în evidenţă în asemenea sindroame epidemice

Tabelul XXXV

Antigenele Esch. coli

Denumirea antigenului	Prezența în bacterie	Rezistența la agenți variați				Determinarea „O”-inaglutinabilității	Rezistența la bacterioliză, fagocitoză și bacteriofag	Patogenitate la om	Hemoliză	Efect necrotic	Tehnica aglutinării	Caracterul aglutinării
		căldură	alcool	formol	HCl							
„O”	somatic	termorezistent $2^1/_2$ ore la 100°	rezistă	rezistă	rezistă	aglutinabil „O”	rezistență slabă	redusă			în tuburi, 24 de ore la 50°	granular
„K“ „L”	de înveliș	termolabil, distrus la 100° după 1 oră	distrus	rezistă	distrus	+80 % tulpini „O”-inaglutinabile	rezistență slabă	foarte patogen	adesea hemolitic	adesea necrotic	1. Aglutinare pe lamă. 2. În tuburi 2 ore la 37°; 20 de ore la temperat. camerei	granular; rar aparțin grupului 8 și 9
„K“ „A”	capsular	termostabil, nu este distrus după $2^1/_2$ ore la 100°	distrus	rezistă	rezistă	+20 % tulpini „O”-inaglutinabile	rezistență pronunțată	patogenitate redusă	nehemolitic	slab necrotic	idem	granular, aparțin mai ales grupului 8 și 9
„K“ „B”	de înveliș	termolabil distrus la 100° după o oră; este păstrată puterea de adsorbție	rezistă	rezistă	rezistă	„O”-inaglutinabilitate		foarte patogen la nou-născuți și la sugari	nehemolitic	absent	idem	granular
„H”	ciliar	termolabil, distrus la 100°	distrus	rezistă	distrus						în tuburi 2 ore la 50°	floconos

Tabelul XXXVI

Schema antigenică de diagnostic (Kauffmann, Knipschildt şi Vahlne)

Grup	Antigene		
	O	K	H
1	1	1 L	(7)
	1	51 L	(7)
2	2	1 L	4
	2	1 L	5
	2	1 L	6
	2	1 L	(7)
	2	2 a, 2 b L	1
	2	5 L	(4)
	2	5 L	4
	2	7 L	7
	2	51 L	(7)
3	3	2 a, 2 b L	2
4	4	3 L	(5)
	4	6 L	5
	4	12 L	(5)
	4	52 L	(4)
5	5	4 L	4
6	6	2 a, 2 c, L	1
	6	13 L	(1)
	6	15 L	16
	6	.	10
	6	53 L	.
	6	54 L	10
7	7	1 L	.
	7	7 L	4
8	8	8 L	4
	8	8 L	20
	8	25 B	9
	8	25 B	19
	8	27 A	(10)
	8	28 A	19
	8	40 A	(9)
	8	41 A	11
	8	42 A	(4)
	8	43 A	11
	8	44 A	.
	8	45 A	9
	8	46 A	4
	8	47 A	2
	8	48 A	9
	8	48 A	19
	8	49 A	11
	8	49 A	21
	8	50 A	(9)
9	9	9 L	12
	9	26 A	10
	9	26 A	(19)
	9	28 A	.
	9	29 A	.
	9	30 A	10
	9	30 A	19
	9	31 A	4
	9	32 A	5
	9	32 A	(10)
	9	33 A	.
	9	34 A	.
	9	35 A	.
	9	36 A	(19)
	9	37 A	.
	9	38 A	.
	9	39 A	9
	9	55 A	.
10	10	5 L	4
11	11	10 L	10
12	12	5 L	.
13	13	11 L	11
	13	.	11
14	14	7 L	.
15	15	14 L	4
	15	.	17
	15	.	12
16	16	1 L	.
17	17	16 L	18
	17	.	13
18	18	1 L	7
	18	5 L	(4)
	18	5 L	7
	18	.	14
19	19a, 19b	.	7
	19a	.	.
20	20	17 L	.
21	21	4 L	19
	21	11 L	10
	21	14 L	(4)
	21	20 L	(4)
22	22	13 L	1
	22	24 L	.
23	23	18 L	15
	23	21 L	.
	23	22 L	.
24	24	.	.
25	25	19 L	12
	25	23 L	.

Legendă: . = antigene care nu au fost încă puse în evidenţă.

apărute în diferite maternități în intervalul 1950-1959, tipurile de *Esch. coli* $O_{26}B_6$, $O_{55}B_5$, $O_{111}B_4$. În ultima vreme, Nestorescu și colaboratorii (1964) au constatat apariția în enteritele infantile a noi tipuri serologice, printre care $O_{125}B_{15}$; $O_{126}B_{16}$, $O_{128}B_{12}$ și O_{114}.

Cercetînd frecvența acestor tipuri serologice la copii sănătoși, Nestorescu, Popovici și colaboratorii găsesc o proporție de 5,7% în timp ce la copiii între 0 și 5 ani cu tulburări intestinale au semnalat o frecvență de 15,3–17%.

În fine *Esch. coli a* fost incriminat uneori în etiologia toxiinfecțiilor alimentare.

Boala la animale. Așa după cum am arătat, Jensen a descris la vițel nou-născuți un sindrom diareic asemănător, din care a izolat unele tulpini de *Esch. coli* cu care a reprodus boala la viței nou-născuți.

Boala experimentală. *Esch. coli* este în genere patogen pentru animalele de laborator. Inocularea unor doze convenabile de cultură pe cale intravenoasă sau intraperitoneală la iepure, șoarece sau cobai poate produce moartea animalelor.

În cazul tipurilor serologice incriminate în etiologia diareei maligne a nou-născuților, Giles și colaboratorii (1949), Davîdov (1951) au reprodus boala la iepuri și pisoi. Combiescu și colaboratorii în 1957 au obținut o mortalitate de 64–100% cu stare toxico-septică, la iepuri în primele 24 de ore de la naștere, prin administrare cu sonda în stomac a culturilor de *Esch. coli* $O_{55}B_5$.

Imunitate. Imunitatea în infecțiile colibacilare este puțin cunoscută. Aceste infecții nu numai că nu determină rezistență, dar arată chiar o supărătoare tendință la cronicitate și recidivă.

La diareea malignă a nou-născuților nu s-au putut pune în evidență anticorpi specifici, față de tulpinile de *Esch. coli*, incriminate în etiologia sindromului și nici nu s-a putut pune în evidență o relație imunologică cu ajutorul testelor cutanate practicate cu antigene microbiene.

În infecțiile cronice ale adulților și bătrînilor, persistența îndelungată a *Esch. coli* în tractul urinar arată, de asemenea, o deficiență în instalarea stării de imunitate.

Tratament specific. Printre produsele biologice specifice folosite în tratamentul infecțiilor colibacilare trebuie menționate următoarele:

Serul anticolibacilar, preparat după metoda preconizată de către Vincent, a dovedit oarecare putere antitoxică; după administrarea acestui ser se asistă la dezintoxicarea bolnavilor.

Vaccinurile anticolibacilare și mai ales autovaccinurile s-au dovedit în unele cazuri clinice folositoare în tratamentul complex al bolnavilor, mai ales în cazurile în care antibioticele singure nu dau rezultate.

Bacteriofagul anticoli, cu spectru larg de acțiune, a dat uneori rezultate spectaculare; în alte cazuri, aplicarea bacteriofagului s-a dovedit ineficace. Administrarea produsului se face pe cale orală și în aplicații locale.

Terapia asociată (chimioterapia și produse biologice) pare a fi cea mai eficientă.

Diagnosticul de laborator

Diagnosticul de laborator se bazează pe izolarea și identificarea germenilor în produsele patologice.

Diagnosticul serologic nu este eficient, datorită, pe de o parte, coexistenței în intestin a mai multor tipuri serologice, unele din ele avînd o durată cu totul trecătoare, iar pe de alta, heterogeneității marcate a structurii antigenice care caracterizează *Esch. coli*.

Produsele patologice la care ne vom adresa diferă în raport cu localizarea infecției, și anume:

— sînge (în cazul infecțiilor generalizate);
— urină (în infecțiile tractului urinar);
— materii fecale (în infecții localizate la tubul digestiv);
— puroi, exsudate (din focare inflamatoare);
— lichid cefalorahidian (în localizări meningiene).

Recoltarea și transportul produselor de cercetat se fac în condițiile obișnuite, deja descrise.

Examenul sîngelui. Sîngele, recoltat în condiții riguroase de asepsie, este însămînțat la patul bolnavului în bulion simplu în proporție de 10%. După 24 de ore de incubare la 37°, se efectuează o primă trecere pe mediu solid (geloză înclinată), după care mediile sînt incubate din nou la 37°. După alte 24 de ore se examinează dezvoltarea culturilor. Dacă mediul a rămas steril, se efectuează o nouă trecere. Manopera este repetată zilnic și numai dacă, după o urmărire de 7—10 zile, mediile au rămas sterile se poate conchide că hemocultura este negativă. În cazul cînd la una din treceri s-au dezvoltat colonii, se procedează la identificarea lor, pe baza caracterelor morfologice, biochimice și serologice.

Examenul urinii. Se însămînțează urina ca atare sau sedimentul obținut prin centrifugare, în mod aseptic, în bulion și pe un mediu diferențial (Drigalski sau geloză lactozată cu albastru de bromtimol, ca indicator). După incubare la 37°, cultura de bulion este cercetată în preparat proaspăt, iar coloniile lactozo-pozitive sînt identificate după celelalte caractere biochimice și serologice.

Examenul materiilor fecale. Recoltarea se face din scaunul emis spontan sau cu ajutorul sondei Nelaton. Produsul suspensionat în ser fiziologic este însămînțat pe medii diferențiale (mediul Drigalski, mediul Vogelsang sau mediul Levin cu albastru de metilen-eozină).

Prepararea mediului albastru de metilen-eozină

Geloză 2% pH 7,4 conținînd peptonă 10‰ și fosfat bipotasic anhidru (PO_4HK_2) 2‰	1 000 ml
Lactoză, soluție 20%	50 ml
Eozină galbenă (Hollborne) soluție 2%	20 ml
Albastru de metilen 0,5%	13 ml

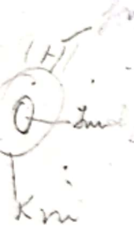
După topirea gelozei la baia de apă și răcire la 50°, se adaugă celelalte ingrediente. Se amestecă mediul și se toarnă în plăci Petri. Mediul neînsămînțat are o culoare roșie-cărămizie. Coloniile de *Esch. coli* apar negricioase, cu luciu metalic, ca mici picături de fucsină, în timp ce coloniile celorlalte enterobacteriacee apar de culoare roz spălăcit, necaracteristice.

Însămînțarea pe mediile solide se face în striuri, căutînd să se obțină colonii izolate. Întrucît în materiile fecale coexistă mai multe tipuri serologice de *Esch. coli*, se recomandă examinarea a cît mai multe colonii. În acest scop se repică minimum 10 colonii, care sînt însămînțate sub formă de sectoare, pe o altă placă cu mediu diferențial. Culturile obținute sînt apoi identificate pe criterii morfologice, biochimice și serologice.

În diagnosticul curent se cercetează o serie de reacții fermentative (lactoză, adonită, inozită), reacția indolului, reacția roșului de metil, reacția Voges-Proskauer, producția de H_2S și cultivarea pe medii cu citrat.

Examenul puroiului, vărsăturilor, probelor de alimente, fragmentelor de organe recoltate de la cadavre. Produsele în stare solidă sînt triturate în ser fiziologic, cele lichide sau semilichide sînt de asemenea suspensionate în ser fiziologic, examinarea suspensiilor obținute efectuîndu-se după tehnica expusă la celelalte produse.

Identificarea serologică se efectuează față de seruri specifice, prin aglutinări pe lamă și în tub.



Pentru determinarea antigenelor somatice ,,O'' se folosesc culturi încălzite două ore și jumătate la 100°, pentru acele ,,H'' culturi în bulion, formolate $4^0/_{00}$, în timp ce pentru cercetarea antigenelor de suprafață ,,K'' se folosesc culturi vii. Citirea aglutinărilor ,,O'' se face după incubare 20 de ore la 52° sau 37°, a celor ,,H'' după 2 ore la 52° sau 37°, iar a celor ,,K'' după 2 ore la 37° și 20 de ore la temperatura camerei.

În afara metodelor de identificare arătate mai sus, se recomandă în diagnosticul tulpinilor de *Esch. coli* izolate din enterite și unele teste suplimentare :

a) testele biochimice : 1) reacția d'Alessandro și Comes (bazată pe cultivarea în prezența acidului β-fenil propionic) și 2) cercetarea lizindecarboxilazei (Moeller și Carlquist);

b) teste bazate pe sensibilitatea la fagi specifici (lizotipia) după metoda P. Nicolle și colaboratorii;

c) identificarea *Esch. coli* enteropatogen cu ajutorul microscopiei cu fluorescență, folosită pentru prima dată de către Whitaker și colaboratorii (1958), este o metodă rapidă de diagnostic, deosebit de promițătoare.

Epidemiologie

Printre infecțiile cauzate de *Esch. coli*, diareea malignă a nou-născuților are o epidemiologie mai bine cunoscută. Aspectul epidemic al infecției se constată mai des în maternitățile mari decît în cele mici, factorul favorizant fiind legat mai cu seamă de circulația intensă pe care cele dintîi o prezintă în funcționalitatea lor.

Sursa de infecție, caracterizată printr-o capacitate mare de difuzibilitate și contagiozitate, este introdusă în maternitate cel mai adesea de către un adult (moașe de teren, mame etc.), care nu prezintă nici un fel de tulburare intestinală. Germenii microbieni cauzatori ai bolii au fost întîlniți pe obiecte, biberoane, scutece, mese de înfășat etc., ca și în aer. Nestorescu și Popovici au pus în evidență *Esch. coli* cu antigen ,,B'' pe muște. Prezența germenilor respectivi a fost arătată și în fecalele animalelor peridomestice, ca : pisică, oaie, porc, bovidee etc. (Nestorescu, Popovici și colaboratorii, 1955), precum și la oamenii care au avut contact, sub o formă sau alta, cu maternitatea în care a izbucnit epidemia.

Aceste observaţii trebuie avute în vedere în privinţa interpretărilor necesare care se fac cu ocazia epidemiilor de enterite şi diaree malignă cu *Esch. coli* enteropatogen.

Diareea malignă a nou-născuţilor loveşte deopotrivă băieţii, ca şi fetele, infecţia putînd apărea din a doua zi de viaţă. Pe măsură ce nou-născuţii înaintează în vîrstă (a 14-a — a 15-a zi), gravitatea ca şi incidenţa îmbolnăvirii scad.

În cazurile netratate, mortalitatea este excesivă ; ea poate ajunge la 80% din efectivul de nou-născuţi.

Măsura de combatere cea mai eficace este evacuarea la domiciliu a nou-născuţilor, dispensarizarea şi tratarea lor şi închiderea maternităţii în vederea dezinfecţiei, depistării purtătorilor şi tratării stării lor de purtător.

Infecţiile urinare colibacilare, de asemenea, au o epidemiologie proprie. Ele adaugă un procent ridicat la manifestarea infecţiilor intraspitaliceşti. *Esch. coli*, cauzînd infecţii urinare, cu recăderi multiple pe un fond evoluînd cronic, trece cu uşurinţă de la un bolnav la altul sau de la un bolnav urinar infectat la un bolnav indemn de infecţie. Folosirea instrumentarului insuficient sterilizat, ca şi menţinerea îndelungată a cateterelor sînt mijloacele cele mai obişnuit constatate în propagarea infecţiei.

Alkalescens dispar

În grupul *Escherichia* sînt incluse în clasificarea de care ne servim şi tulpinile cunoscute sub numele de *Alkalescens dispar*, altădată cuprinse în grupul *Shigella*.

Descrise pentru prima oară de către Andrewes (1918) şi numite *B. alkalescens* şi *B. dispar*, pot fi definite ca tulpini de *Escherichia* imobile şi neproducătoare de gaz în procesele de fermentare.

Habitat. Sînt găsiţi uneori în intestinul oamenilor sănătoşi.

Caractere morfologice Cu o morfologie asemănătoare cu a *Esch. coli*, tulpinile de *Alkalescens dispar* sînt imobile.

Caractere de cultură asemănătoare cu *Esch. coli*.

Caractere biochimice şi de metabolism : aerob, se dezvoltă în condiţii optime la 37° ; fermentează manita şi glucoza fără producere de gaz, nu fermentează adonita şi inozita, fermentează tardiv sau de loc lactoza ; formează indol ; reduc nitraţii, în nitriţi, reacţia roşului de metil este pozitivă, iar reacţia Voges-Proskauer este negativă. Nu formează H_2S, nu lichefiază gelatina, nu descompun ureea. Nu folosesc citratul ca unică sursă de carbon (nu cresc pe mediul Simmons) ; cresc însă pe agar amoniu conţinînd glucoză (Simmons + glucoză).

Structura antigenică : conţin antigene somatice „O" şi antigene de înveliş „K", multe din ele identice sau strîns înrudite cu cele de *Esch. coli*. Pe baza antigenelor „O", Frantzen (1950, 1951) a deosebit 8 grupe serologice.

Redăm în tabelul XXXVII schema antigenică de diagnostic propusă de Frantzen.

Caractere de patogenitate. Patogenitate îndoielnică. A fost incriminat ca agent cauzal în unele enterite şi infecţii ale tractului urinar.

Tabelul XXXVII

Grup O	Antigene		Denumiri anterioare
	O	K	
1	1a, 1 b 1a, 1b 1a	1a, 1b 1a 1a, 1b	*Shigella alkalescens* Tipul I
2	2 2 2	1a 1a, 1b 1a, 1b	*Shigella alkalescens* Tipul II *Shigella flexneri* *Shigella tielé*
3	3a 3a 3a 3a 3a, 3b	2 2 2 2 2	*Shigella alkalescens* Tipul III *Shigella dispar* Tipul II a sau *B. ceylonensis B.* *Shigella dispar* Tipul II b *Shigella dispar* Tipul II c
4	4 4 4	3 — ·	*Shigella dispar* Tipul I *Shigella madampensis*
5	5 5	4 3	
6	6	5	*Shigella dispar* Tipul III
7	7	1a	
8	8	·	

Legendă: — = tulpină fără antigen K
· = antigen K necercetat.

Diagnosticul de laborator. Se folosește aceeași tehnică de izolare și identificare ca și cea expusă pentru *Esch. coli*.

Absența mobilității, lipsa producerii de gaz în procesele de fermentare a zaharurilor, precum și fermentarea tardivă sau absentă a lactozei, permit diagnosticul diferențial față de *Esch. coli*.

Genul (grupul) Salmonella

Definiție Este constituit dintr-un foarte mare număr de serotipuri reprezentate prin germeni cu formă de bacili, mobili, gram-negativi, avînd o serie de caractere biochimice comune, printre care lipsa de fermentare a lactozei, zaharozei și adonitei, producere de H_2S, folosirea citratului ca unică sursă de carbon, lipsa formării de indol, incapacitatea de descompunere a ureei. Înrudite serologic, pot fi diferențiate și identificate după structura lor antigenică.

Obligatoriu paraziți, salmonelele pot fi patogene pentru om și animale.

Istoric. Prima Salmonelă a fost descrisă de către Salmon și Smith, în 1885, ca bacilul *hog cholerae* american (bacilul holerei porcine). Ulterior s-au descris, rînd pe rînd, alte specii, numărul lor depășind la sfîrșitul anului 1962, 830 de specii (Kauffmann, 1963); acest număr crește pe măsură ce alte tipuri serologice sînt recunoscute.

Identificarea numeroaselor specii sau serotipuri a fost posibilă numai pe baza cunoștințelor asupra structurii lor antigenice.

Încă din 1903, Smith și Reagh au descris caracteristicile antigenelor flagelare și somatice ale tulpinilor de *Salmonella*, dar cunoașterea temeinică a diferențelor dintre antigenele somatice și cele flagelare se datorește mai ales lucrărilor lui Weil și Felix, efectuate asupra germenilor din grupul *Proteus*.

În 1921, Andrewes a descris fenomenul variației de fază a antigenelor flagelare „H", iar Arkwright, în 1927, a demonstrat caracteristicile germenilor de formă „S" și „R", obținuți prin disociație microbiană.

Studiile lui Boivin și L. Mesrobeanu (1933-1935), Raistrick și Topley (1934) și, ulterior, Morgan, au arătat constituția chimică a antigenelor somatice.

Descoperirea antigenului „Vi" de către Felix și Pitt (1935) a constituit o dată importantă în ansamblul cercetărilor asupra structurii antigenice a salmonelelor. Descoperirea acestui antigen a avut repercusiuni foarte întinse asupra imunologiei, metodelor de diagnostic și epidemiologiei infecțiilor prin salmonele, ca și a altor enterobacteriacee.

Identificarea și etichetarea salmonelelor în raport cu structura lor antigenică au fost inițiate de către White (1926 și 1929), continuate și extinse de către Kauffmann (1929, 1930, 1931, 1934, 1936, 1952, 1953, 1957, 1958, 1959, 1960, 1961 și 1962).

Pe baza cercetărilor lui Craigie și Branden, Scholtens, Sertic și Bulgakov (1936), Craigie și Yen (1938) au obținut o serie de fagi „Vi" de tip, cu ajutorul cărora tulpinile de *S. typhi* cu antigen „Vi" au putut fi diferențiate în tipuri fagice sau lizotipuri. Lizotipia a fost ulterior extinsă și asupra *S. paratyphi B* (Felix și Callow), *S. typhimurium* (Felix-Callow, Scholtens), precum și la alte salmonele (*S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. gallinarum* etc.), metoda constituind un mijloc modern de investigație în epidemiologie.

Habitat. Salmonelele sînt foarte răspîndite în natură. Ele sînt întîlnite ca paraziți intestinali la păsări, mamifere și om (purtători și bolnavi). Sînt răspîndite cu dejecțiile acestora în mediul extern, unde grație unui grad marcat de rezistență față de factorii de mediu pot supraviețui o perioadă de timp și pot infecta gazde noi.

Caractere morfologice. Salmonelele apar sub formă de bastonașe de 2-3 μ lungime și 0,6 μ grosime, dimensiuni care variază în raport cu condițiile de mediu. Sînt mobili, grație unui aparat ciliar bine dezvoltat, cu cili peritrichi (excepție *S. gallinarum* și *S. pullorum*). Sînt necapsulați, unele specii (exemplu *S. paratyphi B*) pot dezvolta variante mucoide de germeni, înconjurați de o capsulă de natură polizaharidică; nesporulați; sînt Gram-negativi.

Caractere de cultură. Se dezvoltă ușor pe medii obișnuite. Unele specii, ca *S. paratyphi A.*, *S. sendai* etc., cresc sărăcăcios.

Pe medii lichide, ca bulion și apă peptonată, formele „S" tulbură uniform mediul, în timp ce formele „R" produc culturi sedimentate la fundul tubului, lăsînd mediul clar.

Bila favorizează creșterea.

Pe geloză, salmonelele dezvoltă colonii de 2-3 mm diametru, variabile ca formă și dimensiuni, în raport cu mediul de cultură și cu specia.

În forma „S", coloniile sînt rotunde, netede, lucioase, cu margini regulate, ușor detașabile de mediu, producînd suspensii omogene în medii lichide și în soluții cloruro-sodice.

În forma „R", coloniile apar uscate, zbîrcite, cu margini neregulate, aderente la mediu. Suspensiile acestei forme în medii lichide și soluții cloruro-sodice sînt neomogene, cu aspect granular.

Între formele „S" și „R" se poate observa o gamă întreagă de variante intermediare „S-R".

Variantele mucoide dezvoltă colonii mari, cu centru turtit, înconjurate de o margine mucoasă.

Uneori, în anumite condiții de cultură, salmonelele pot dezvolta colonii pitice, de dimensiuni punctiforme, transparente (formele „G").

Caractere biochimice și de metabolism. Aerobi și facultativ anaerobi, germenii din grupul *Salmonella* pot să se dezvolte între 18 și 42°, cu optimum la 37° ; pH optim de dezvoltatre este situat între 7,2 și 7,6. Posedă o largă activitate fermentativă. Cu ajutorul reacțiilor de fermentare și al altor reacții biochimice s-a putut, pe de o parte, delimita grupul *Salmonella* de celelalte *Enterobacteriaceae*, iar pe de altă parte, s-au putut deosebi, pînă la un punct, tipurile serologice unele de altele și chiar stabili subtipuri biochimice în interiorul aceluiași tip serologic.

1. *Caractere biochimice comune* germenilor din grupul *Salmonella* :

— activitate fermentativă : nu atacă adonita, nu fermentează lactoza (cu excepția unor variante de *S. anatum*, *S. newigton*, *S. paratyphi B.* și *S. typhimurium*), zaharoza (cu excepția *S. horsham*) și salicina. Fermentează prompt glucoza, cu producere de gaz (cu excepția *S. typhi* care nu produce gaz), manita (cu excepția *S. typhisuis*), sorbita și maltoza ;

— reacția indolului este negativă pentru majoritatea salmonelelor.

— lichefierea gelatinei este absentă la aproape toate speciile ;

— producerea de H_2S este observată de cele mai multe ori ;

— laptele turnesolat este acidifiat în mod tranzitoriu, cu alcalinizare consecutivă. Reacția roșului de metil este în genere pozitivă, în timp ce reacția Voges-Proskauer este negativă. Nu descompun ureea. Folosesc citratul ca unică sursă de carbon.

Salmonelele nu se dezvoltă în mediu cu KCN și malonat de sodiu, nu elaborează fenilalanindezaminază, în schimb produc lizindecarboxilază, argindehidrolază și ornitindecarboxilază

2. *Caractere biochimice diferențiale* între serotipurile de *Salmonella*. Kauffmann a stabilit o schemă asupra comportării biochimice a tipurilor serologice de *Salmonella*, folosind studiul acțiunii fermentative asupra următoarelor 6 zaharuri : arabinoza, dulcita, inozita, ramnoza, trehaloza și xiloza, fermentarea glicerolului prin reacția Stern, producerea de H_2S, lichefierea gelatinei și acțiunea asupra acizilor organici : d-tartrat, l-tartrat, i-tartrat, citrat de sodiu și mucat.

Prezentăm în tabelul XXXVIII schema biochimică de diagnostic al salmonelelor, după Kauffmann.

3. **Caractere biochimice diferențiate între variante în interiorul aceluiași tip serologic.** Studiul caracteristicilor biochimice a permis, în sfîrșit, recunoașterea mai multor variante în interiorul aceluiași tip serologic. Exemplu de asemenea variante biochimice îl oferă *S. enteritidis*, cu variantele

Tabelul XXXVIII

Tipul	A	D	I	R	T	X	S	H	G	d	l	l	C	M
Grup A														
S. paratyphi A	+	−+	−	+	+	−	−	V	−	−	−	−	−	−
Grup B														
S. kisangani	+	+	V	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. hessarek	−	+	−	+	+	x	−	+	−	+	x	x	+	+
S. arechaveleta	+	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	−	+	+
S. bispebjerg	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. abortus equi	+	−+	−	+	−+	+	−	−	−	+	x	+	+	−
S. tinda	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. paratyphi B	+	V	V	V	+	+	V	+	−	−	+	V	V	+
S. java	+	V	V	V	+	+	V	+	−	+	V	V	+	+
S. limete	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. abony	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. abortus bovis	+	+	−	V	+	−+	++	+	$\boxed{+}$	+	x	−	V	+
S. wagenia	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	x	+	+
A schleissheim	+	−	−	+	+	V	++	+	$\boxed{+}$	+	x	−	+	+
S. wien	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. abortus ovis	x	V	−	x	−	V	−	x	−	+	x	(x)	+	−
S. altendorf	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. stanley	+	+	−	+	+	+	V	+	−	+	+	V	+	+
S. cairo	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. schwarzengrund	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. 4, 12, 27 : d : e, n,x	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. salinatis	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. saint-paul	+	+	V	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. reading	+	+	V	V	+	+	V	+	−	+	x	−	+	+
S. kaposvár	+	+	−	+	+	+	−	+	−	+	+	−	+	+
S. kaapstad	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. chester	+	+	V	−+	+	+	++	+	−	+	x	−	+	+
S. san diego	+	+	V	+	+	+	++	+	−	+	x	−	+	V
S. derby	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. essen	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. 4, 5, 12 : g, m, s :—	+	+	+	+	+	−	++	+	−	x	−	+	+	+
S. california	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. kingston	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. budapest	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. banana	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	x	+	+
S. typhimurium	+	+	V	V	V	V	V	+	−	V	+	V	V	+
S. texas	+	+	+	+	+	+	++	+	$\boxed{-+}$	+	x	−	+	+
S. bredeney	+	+	V	+	+	+	++	+	−	+	x	−	+	+
S. kimuenza	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. brandenburg	+	+	−	+	+	+	V	+	−	+	+	−	+	V
S. heidelberg	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. coeln	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. ball	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. 4, 5, 12 : z, 1, 2	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. 4, 12 : z : 1, 5	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	V	+	+
S. stanleyville	+	+	V	+	+	+	V	+	−	+	V	+	+	+
S. haifa	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. ituri	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. brancaster	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+

Tabelul XXXVIII (continuare)

Tipul	A	D	I	R	T	X	S	H	G	d	l	i	c	M
Grup C_1														
S. san juan	+	+	V	+	+	+	++	+	$\boxed{-+}$	+	V	−	+	+
S. austin	+	+	+	+	+	+	++	+	$\boxed{-+}$	+	+	−	+	+
S. oslo	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. denver	+	+	−	+	+	+	++	+	$\boxed{-+}$	+	+	−	+	+
S. edinburg	+	+	+	+	−+	+	++	+	$\boxed{+}$	+	+	−	+	+
S. georgia	+	+	+	+	+	+	++	+	$\boxed{-+}$	+	+	−	+	+
S. leopoldville	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. paratyphi C	V	+	−	−+	−+	+	−	+	−	+	+	−	+	−
S. cholerae suis	−	x	−	+	−	+	−	V	−	+	−	x	+	x
S. kunzendorf	−	x	−	+	−	+	−	+	−	V	x	x	+	x
S. typhi suis	+	−+	−	−+	−+	+	−	−	−	−	−	−	−	−
S. birkenhead	+	+	−	+	+	+	−	+	−	+	+	−	x	+
S. mission	+	+	−	+	+	+	++	+	$\boxed{-+}$	+	+	−	+	+
S. mision var. isangi	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. amersfoort	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. livingstone	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. lomita	+	+	−	+	+	+	++	+	$\boxed{-+}$	+	x	−	+	+
S. norwich	+	+	+	V	+	+	V	+	−	+	V	V	V	+
S. braenderup	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. montevideo	+	+	V	+	+	+	++	+	−	+	V	−	+	+
S. menston	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. oranienburg	+	+	−	+	+	+	V	+	−	+	x	−	+	+
S. garoli	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. thompson	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	V	+	+
S. daytona	+	+	−+	x	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. singapore	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. concore	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. irumu	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. bonn	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. postdam	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. colorado	+	+	−	−+	+	+	++	+	−	x	−	−	+	−
S. jerusalem	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. ness-ziona	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	V	+	+
S. makiso	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. virchow	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	V
S. infantis	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. 6, 7 : r : 1, 7	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. papuana	+	+	−	+	+	+	++	−	−	+	+	−	+	+
S. richmond	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. bareilly	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. hartford	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. mikawasima	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. aequatoria	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. eschweiler	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. mbandaka	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. tennessee	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. lille	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
Grup C_2														
S. curaçao	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	−	−	x	−
S. narashino	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. nagoya	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	−

Tabelul XXXVIII (continuare)

Tipul	A	D	I	R	T	X	S	H	G	d	l	i	C	M
S. galuni	+	+	–	+	+	+	++	+	–	+	–	–	+	+
S. 6, 8 : b : e, n, z_{15}	+	+	+	+	+	+	++	+	–	+	+	–	+	+
S. banalia	+	+	–	+	+	+	++	+	–	+	+	+	+	+
S. belem	+	+	+	+	+	+	++	+	–	+	–	–	+	+
S. quiniela	+	+	+	+	–	+	–	+	–	+	x	–	+	+
S. muenchen	+	+	+	+	+	+	++	+	–	+	+	+	+	+
S. manhattan	+	+	+	+	+	+	++	+	–	+	+	+	+	+
S. newport	+	+	–	+	+	+	++	+	–	V	+	+	+	+
S. kottbus	+	+	+	+	+	+	++	+	–	+	+	+	+	+
S. lindenburg	+	+	–	+	+	+	++	+	–	+	+	+	+	+
S. takoradi	+	+	+	+	+	+	++	+	–	+	+	+	+	+
S. bonariensis	+	+	–	+	+	+	++	+	–	+	–	–	+	+
S. litchfield	+	+	–	+	+	+	++	+	–	+	+	+	+	+
S. manchester	+	+	–	+	+	+	++	+	–	+	+	–	+	+
S. fayed	+	+	–	+	+	+	++	+	–	+	x	–	+	+
S. bovis morbificans	+	+	V	+	+	+	++	+	–	+	+	V	+	+
S. hidalgo	+	+	+	+	+	+	++	+	–	+	+	+	+	+
S. tananarive	+	+	–	+	+	+	++	+	–	+	+	+	+	+
S. praha	+	+	–	+	+	+	++	+	–	+	+	–	+	+
S. 6, 8 : z_4, z_{23} : –	+	+	+	+	+	+	++	+	–	+	+	+	+	+
S. duesseldorf	+	+	–	+	+	+	++	+	–	+	x	–	+	+
S. tallahassee	+	+	–	+	+	+	++	+	–	V	+	+	+	+
S. hadar	+	+	+	+	+	+	++	+	–	+	+	+	+	+
S. glostrup	+	+	–	+	+	+	++	+	–	+	+	–	+	+
S. sanga	+	+	–	+	+	+	++	+	–	+	+	+	+	+
S. virginia	+	+	+	+	+	+	++	+	–	+	+	x	+	+
S. emek	+	+	+	+	+	+	++	+	–	+	+	–	+	+
S. kentucky	+	+	+	+	+	+	V	+	–	+	+	+	+	+
S. amherstiana	+	+	+	+	+	–	++	+	–	+	+	+	+	+
S. corvallis	+	x	+	+	+	+	++	+	–	+	+	+	+	+
S. albany	+	+	+	+	+	+	++	+	–	+	+	+	+	+
Grup D														
S. sendai	+	x	–	–+	+	–+	–	–	–	–	–	–	–	–
S. miami	–	–	–	+	+	+	++	+	–	(x)	–	–	+	–
S. loma-linda	+	–	–	+	+	+	+	+	–	–	–	–	+	+
S. durban	+	+	–	+	+	+	++	+	–	+	x	–	+	+
S. onarimon	+	+	+	+	+	+	++	+	–	–	+	+	+	+
S. alabama	+	+	+	–	+	+	++	+	–	+	+	+	–	+
S. typhi	V	x	–	–	+	V	–	V	–	+		–	V	x
S. ndolo	+	+	–	+	+	+	++	–	–	+	+	–	+	+
S. zega	+	+	–	+	+	+	++	+	–	+	+	–	+	+
S. eastbourne	+	+	V	+	+	+	++	+	–	+	+	–	+	+
S. israel	+	+	–	+	+	+	++	+	–	+	+	–	+	+
S. berta	+	+	–	+	+	+	++	x	–	+	+	+	+	+
S. enteritidis	V	V	–	+	+	+	V	+	–	V	V	V	V	V
S. blegdam	+	–+	–	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+
S. pensacola	+	+	–	+	+	+	++	+	–	+	+	–	+	+
S. dublin	V	V	–	V	+	V	V	+	–	+	+	–	+	V
S. rostock	+	+	–	–	+	+	–	+	–	+	+	–	+	+
S. moscow	+	–+	–	–+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+
S. neasden	+	+	+	+	+	+	++	+	$\boxed{-+}$	–	–	–	+	+
S. seremban	+	+	+	+	+	+	++	+	–	+	+	+	+	+
S. marylebone	+	+	–	+	+	+	++	+	–	+	+	+	+	+
S. claibornei	+	+	–	–+	+	+	–	+	–	+	+	–	+	+
S. mendoza	+	+	+	+	+	+	++	+	–	+	+	+	+	+
S. panama	+	V	–	+	+	+	++	+	–	V	x	–	+	+

Tabelul XXXVIII (continuare)

Tipul	A	D	I	R	T	X	S	H	G	d	l	i	C	M
S. goettingen	+	+	−	+	+	+	V	+	−	+	+	−	+	+
S. dar-es-salaam	+	+	−	+	+	+	++	+	$\boxed{-+}$	x	−	−	+	+
S. napoli	+	+	−	+	+	+	−	+	−	V	−	−	+	+
S. javiana	+	V	−	+	+	+	++	+	−	+	x	−	+	+
S. shoreditch	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. 9 : z : e, n, x	+	+	−	+	+	+	++	+	$\boxed{-+}$	−	−	−	+	+
S. wangata	+	+	−	+	−+	+	V	+	−	+	+	+	+	+
S. canastel	+	+	+	+	+	+	++	+	$\boxed{-+}$	−	−	−	+	+
S. 9, 12 : z_{35} : z_6	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. 9, 12 : z_{38} : —	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. gallinarum-pullorum	+	V	−	V	V	V	−	V	−	V	V	x	V	V

Grup E_1

Tipul	A	D	I	R	T	X	S	H	G	d	l	i	C	M
S. oxford	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. butantan	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	x	−	+	+
S. shangani	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. vejle	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. muenster	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	x	−	+	+
S. anatum	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. nyborg	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. newlands	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	+	−	+	+
S. meleagridis	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. westhampton	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. zanzibar	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. nchanga	+	+	V	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. london	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	x	−	+	+
S. give	+	+	+	+	+	+	++	+	−	V	V	−	+	+
S. clerkenwell	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. uganda	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. elisabethville	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. simi	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. weltevreden	+	+	−+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. amager	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	V	+	+
S. orion	+	+	+	+	+	+	++	+	−	−	+	+	+	+
S. bolton	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. stockholm	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. lexington	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. coquilhatville	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. cairina	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. macallen	+	+	+	+	+	+	++	+	−+	+	x	−	+	+

Grup E_2

Tipul	A	D	I	R	T	X	S	H	G	d	l	i	C	M
S. newington	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. selandia	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	−	+	+
S. cambridge	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	x	+	+
S. new brunswick	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. kinshasa	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. binza	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+

Tabelul XXXVIII (continuare)

Tipul	A	D	I	R	T	X	S	H	G	d	l	i	C	M
Grup E_3														
S. (3), (15), 34 : e, h : 1, 6	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. canoga	+	+	−	+	+	+	−	−	−	+	+	−	+	+
S. thomasville	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. illinois	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. harrisonburg	+	+	−	+	+	V	++	+	−	+	+	+	+	+
Grup E_4														
S. niloese	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. senftenberg	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. senftenberg var. newcastle	+	+	−	+	+	+	−	−	−	+	+	−	+	+
S. taksony	+	+	+	+	+	+	++	+	−	−	+	+	+	+
S. krefeld	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	+	x	+	+
S. schoeneberg	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. simsbury	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. chittagong	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+	+
Grup F														
S. marseille	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. luciana	+	−	−	+	+	+	++	+	−	+	−	−	+	+
S. pharr	+	+	+	+	+	+	++	+	$\boxed{-+}$	+	+	−	+	+
S. chandans	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. chingola	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. aberdeen	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. veneziana	+	−	−	+	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+
S. pretoria	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. abaetetuba	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. senegal	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	x	−	+	+
S. rubislaw	+	+	V	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. solt	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. tel-hashomer	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
Grup G														
S. ibadan	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. mississippi	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	−	−	+	+
S. atlanta	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	−	−	+	+
S. mishmarhaemek	+	+	+	+	+	x	++	+	−	+	+	−	+	+
S. friedenau	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. grumpensis	+	+	−	+	+	+	−	+	−	+	+	−	+	+
S. wichita	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. 13, 23 : d : e, n, z_{15}	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. havana	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	V	+	+
S. 13, 23 : g, s, (t) : —	+	+	−	+	+	+	++	+	$\boxed{-+}$	+	−	−	+	+
S. worcester	+	+	−	+	+	+	++	+	$\boxed{-+}$	−	−	−	+	+
S. worthington	+	x	+	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. nachshonim	+	+	−	+	+	+	−	+	$\boxed{-+}$	+	−	−	+	+
S. poona	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. 13, 22 : z : 1, 7	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+

Tabelul XXXVIII (continuare)

Tipul	A	D	I	R	T	X	S	H	G	d	l	i	C	M
S. delplata	+	−	−	+	+	+	−	+	$\boxed{-\,+}$	x	−	−	+	−
S. 13,22 : z_{29} : 1,5	+	+	−	+	+	+	++	+	$\boxed{-\,+}$	−	−	−	+	+
S. cubana	+	+	+	+	+	+	++	+	−	x	+	+	+	+
Grup II														
S. heves	+	−+	−	+	+	x	−	+	−	+	+	−	+	+
S. florida	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. albuquerque	+	+	+	+	+	+	++	+	$\boxed{-\,+}$	+	+	−	+	+
S. onderstepoort	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. caracas	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. 6, 14 : 1, v : 1,7	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. horsham	+	−	−	+	+	+	++	x	−	+	+	−	+	+
S. carrau	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	x	−	+	+
S. madelia	+	+	−	+	+	+	V	+	−	+	x	−	+	+
S. homosassa	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. sundsvall	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	−
S. uzaramo	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
Grup I														
S. brazil	+	−+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. 16 : b : 1,2	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. hvittingfoss	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. vancouver	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. weston	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. gaminara	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. nottingham	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. szentes	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	x	+	+	+
S. orientalis	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. shangai	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. salford	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. rowbarton	+	−+	−	+	+	+	++	+	$\boxed{+}$	+	−	−	+	+
S. 16 : z_{29}	+	+	−	+	+	+	++	+	$\boxed{-\,+}$	x	−	−	+	+
S. kirkee	+	+	−	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+	+
S. bleadon	+	+	−	+	+	+	++	+	$\boxed{-\,+}$	+	−	−	+	+
S. matadi	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. morotai	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. carmel	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. usumbura	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. memphis	+	+	−	+	+	+	++	+	$\boxed{-\,+}$	+	x	−	+	+
S. cerro	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. blukwa	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. minnesota	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	x	−	+	+
S. 28 : b : e, n, z_{15}	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. taunton	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. chicago	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+

Tabelul XXXVIII (continuare)

Tipul	A	D	I	R	T	X	S	H	G	d	l	i	C	M
S. kibusi	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. pomona	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. tel-aviv	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. urbana	+	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	−	+	+
S. 30 : i : 1, 2	+	+	V	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. morehead	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. donna	+	+	+	+	+	+	++	+	$\boxed{+}$	+	−	−	+	+
S. matopeni	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. adelaide	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. monschaui	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. 35 : i : e, n, z_{15}	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. alachua	+	+	+	+	+	+	++	+	−	−	−	+	+	+
S. kasenyi	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. mgulani	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. inverness	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. lindi	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. champaign	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	+	−	+	+
S. riogrande	+	+	+	+	+	+	++	+	$\boxed{-+}$	+	x	−	+	+
S. johannesburg	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. duval	+	−	−	+	+	+	−	+	−	+	+	−	+	+
S. allandale	+	+	+	−	+	+	++	+	−	+	+	−	−	−
S. waycross	+	−+	−	+	+	+	++	+	−	+	−	+	+	+
S. uphill	+	+	−	+	+	+	++	+	$\boxed{-+}$	x	−	−	+	+
S. weslaco	+	+	−	+	+	+	++	+	$\boxed{-+}$	+	−	−	+	+
S. berkeley	+	+	+	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. milwaukee	+	+	−	+	+	+	++	+	$\boxed{-+}$	+	+	−	+	+
S. 43 : y : 1,5	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	+	+	+
S. niarembe	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	+	+
S. 45 : c :e, n, x	+	+	−	+	+	+	++	+	−	+	+	−	−	+

Legendă:

A = arabinoză
D = dulcitol
I = inozitol
R = ramnoză
T = trehaloză
X = xiloză
} în bulion peptonat

d = d-tartrat
l = l-tartrat
i = i-tartrat
C = sodium-citrat
M = mucat
} în soluție bacto-peptonă

S = reacția Stern
H = H_2S
G = gelatină

+ = pozitiv după o zi
−+ = pozitiv tardiv
− = negativ după 30 de zile
x = tardiv și neregulat
(x) = de cele mai multe ori neregulat
V = diferite tipuri biochimice

danysz, *chaco* şi *essen*, sau *S. dublin* cu variantele *accra* şi *coeln*, a căror comportare o redăm în tabelul XXXIX

Posibilitatea de a diferenţia variante biochimice în cadrul tipurilor serologice prezintă un deosebit interes pentru investigaţiile epidemiologice în urmărirea sursei de infecţie şi a filiaţiei cazurilor în izbucnirile de toxi-infecţii alimentare.

Tabelul XXXIX

	A	D	R	S	Amoniu-agar cu:				Acizi organici				
					G	A	D	R	d	l	i	C	M
S. enteritidis	+	+	+	++	V	V	V	V	+1	+1–3	+2	+1	+1–8
S. enteritidis var. danysz	V	+	+	–	V	V	V	V	+2–6	V	+2–3	V	+1
S. enteritidis var. chaco	+	–+	+	+	+	+	x	+	+1	+1	+2	+1	+1
S. enteritidis var. essen	+	–+	+	++	+	–	–	+	+1	–14 sau x	–14 sau x	+1–2	+1
S. dublin	x	V	+	+	–	–	–	–	+1–2	+2	–14 sau x	+1–2	V
S. dublin var. accra	+	+	+	+	–	–	–	–	+1	+2	–14	+1	+1
S. dublin var. coeln	x	+	–+	++	–	–	–	–	+1	+2	–14	+1	+1

Legendă:

A = arabinoză
D = dulcitol
R = ramnoză
S = Stern
G = glucoză

d = d-tartrat
l = l-tartrat
i = i-tartrat
C = citrat
M = mucat

Arabinoză, dulcită, ramnoză:
–+ = tardiv pozitiv, după 2–4 zile
– = negativ după 14 zile

Amoniu-agar: + = pozitiv după 1–4 zile
– = negativ după 4 zile sau slab pozitiv.

Acizi organici: V = variabil sau negativ
+1 = pozitiv după o zi
x = tardiv şi neregulat pozitiv sau negativ
–14 = negativ după 14 zile

Rezistenţa la agenţi fizici, chimici şi biologici. Majoritatea culturilor de salmonele sînt distruse prin încălzire timp de 60 de minute la 55° sau în 15–20 de minute la 60°C.

Sublimatul 1‰ şi acidul fenic 5% le omoară în 30 de minute.

În pămînt pot supravieţui pînă la 6 luni, iar pe obiecte, de la 30 de zile la 5 luni.

În gheaţă şi în ape trăiesc luni de zile; supravieţuirea lor în ape este condiţionată de bogăţia acestora în materii organice, de flora de asociaţie şi de acţiunea razelor ultraviolete.

Laptele, constituind un mediu de cultură favorabil, permite viabilitatea lor timp de 30-35 de zile.

Posedă un grad marcat de rezistenţă la acţiunea substanţelor bacteriostatice din grupul coloranţilor trifenilmetanului (fucsină, verde briliant, cristal violet), ceea ce permite folosirea acestor substanţe la prepararea mediilor selective.

Sînt sensibile la acţiunea unor antibiotice printre care: cloromicetină, aureomicină, streptomicină. Sînt rezistente la penicilină. Posedă un grad moderat de sensibilitate la acţiunea sulfamidelor. Sînt sensibile la bacteriofagii specifici.

Structură antigenică. În structura antigenică a salmonelelor sînt cunoscute antigene somatice şi antigene flagelare. Unele specii au şi antigene de înveliş.

Antigenul somatic „O". În afară de caracteristicile generale ale antigenelor somatice, care au fost descrise la capitolul „Enterobacteriaceae" (generalităţi), în grupul *Salmonella* antigenele „O" conferă specificitate de grup fiind comune la mai multe serotipuri.

Pe de altă parte, fiecare serotip de *Salmonella* posedă de obicei mai multe fracţiuni antigenice „O", care pot varia cantitativ. Modificări profunde, calitative, de ordin chimic, au loc în cursul schimbării formelor „S" în forme „R". După gradul de roughizare, complexul polizaharidic al formei „S" este înlocuit parţial sau total prin lipide, caracteristice formelor „R". Antigenul „O" al formelor „R", astfel modificat primeşte simbolul „Ø". Antigenul „O" pare să joace un rol important în patogenitatea salmonelelor, constituind însăşi endotoxina responsabilă de efectele toxice ale germenilor din acest grup. S-au descris pînă în prezent cel puţin 60 de fracţiuni antigenice „O".

Trebuie de asemenea reamintit că unii determinanţi antigenici „O" la *Salmonella* sînt dependenţi de prezenţa fagilor temperaţi (conversie). Dant O-ft

Antigenul flagelar „H". Antigenul „H" imprimă germenilor din grupul *Salmonella* specificitatea de tip. În cursul trecerii de la forma „S" la forma „R" nu suferă modificări. În schimb, se supune fenomenului variaţiei „de fază", descris în 1929 de către Andrewes, fenomen care constă în prezentarea antigenului „H" sub două forme distincte: una, ca antigen specific de tip şi a doua, ca antigen de grup, comun la mai multe specii. S.Tip.

Variaţia de fază a antigenului „H" poate fi observată numai la unele tipuri serologice de salmonele care au primit calificativul de „difazice" în timp ce alte salmonele, la care antigenul flagelar apare totdeauna într-o singură fază, au fost denumite „monofazice". Tipurile difazice prezintă în mod constant antigenul „H" în ambele faze, cu predominaţia uneia din ele. Dacă într-o colonie majoritatea germenilor sînt în fază specifică, colonia se prezintă în faza specifică sau faza 1, iar dacă predomină germenii în fază nespecifică colonia în întregime se consideră în faza nespecifică sau faza 2. Germenii în faza specifică sînt aglutinaţi intens numai de serul specific tipului serologic respectiv, pe cînd germenii în fază nespecifică sînt aglutinaţi de seruri de grup, capabile să aglutineze şi alte tipuri serologice înrudite de *Salmonella*.

Sînt descrise pînă astăzi trei variaţii de fază, şi anume:

1. *Variaţia de fază specifică-nespecifică* (faza 1-2), descrisă de către Andrewes, în care faza specifică este notată cu literele mici ale alfabetului şi litera *z* cu diferite exponente numerice, iar cea nespecifică, prin cifre arabe, de exemplu: „b; 1,2".

2. *Variația de fază* α—β, descrisă de către Kauffmann și Mitsui, în care faza α, notată cu litere mici, corespunde fazei specifice sau fazei 1, iar faza β, notată cu „e, n, x”, fazei nespecifice sau fazei 2.

3. *Variația de fază Edwards și Bruner*, în care se pune în evidență apariția în faza nespecifică a fracțiunii „l, w”, care anterior fusese semnalată numai în faza specifică.

Identificarea tipurilor de *Salmonella* nu se poate efectua decît examinînd colonii de faza 1, singura care asigură specificitatea de tip. Exemplu clasic este cazul *S. paratyphi B.* și *S. typhimurium*, care avînd antigene „O” comune (1, 4, 5, 12) și antigene „H” de fază nespecifică „1, 2” comune, nu pot fi diferențiate decît pe baza antigenelor „H” de fază specifică deosebite, „b” și „i” respectiv.

În afară de variațiile de fază care apar în mod natural, se mai cunosc unele variații de fază care se obțin în mod artificial, prin cultivare pe medii cărora li s-a încorporat ser imun omolog anti-„H” și în care antigenele obișnuite se pierd total sau numai parțial, apărînd antigene noi. Este vorba de așa-numitele „faze induse”, descrise mai întîi de către Kauffmann și Bruner și apoi de alți cercetători. Cultivînd *Salmonella typhi* în prezența serului anti-„d”, Kauffmann a obținut dezvoltarea unui antigen „H” nou, antigenul „j”. Kauffmann considera faza indusă drept faza 3. În ultima vreme, faza 3 a fost obținută și în condiții naturale.

Existența acestor variații de fază implică procese genetice (Stocker, 1949; Lederberg și Iino, 1956; Iino 1963).

Antigenele „K”. Printre antigenele de înveliș s-au pus în evidență, la unele dintre serotipurile de *Salmonella*, antigenul „Vi”, antigenul „5” și antigenul „M”.

a) Antigenul „Vi” a fost descris de către Felix și Pitt (1935) la *S. typhi*, ca un antigen de înveliș. De constituție glucido-lipido-polipeptidică, el se deosebește de antigenul „O” prin conținutul în acizi grași, zaharuri și capacitatea de a precipita în prezența sărurilor de uranil.

Încălzirea la 60° a tulpinilor de *S. typhi*, care posedă antigen „Vi”, distruge capacitatea aglutinantă a acestora în prezența serului anti-„Vi” și reduce puterea lui antigenică. Nu este redusă însă capacitatea lui de adsorbție. Antigenul „Vi” este rezistent la acțiunea alcoolului, formolului; este distrus de fenol și acid clorhidric. Acest antigen conferă germenilor un grad ridicat de patogenitate pentru șoarece, însă nu pentru maimuțe superioare (Edsall). Pe de altă parte, s-a demonstrat că patogenitatea crescută a tulpinilor posedînd antigen „Vi” s-ar datori efectului toxic și nu virulenței. Tulpinile cu antigen „Vi” s-au dovedit rezistente la fagocitoză. Introdus în organism, stimulează producerea de anticorpi specifici. Pus în contact *in vitro* cu un ser conținînd aglutinine anti-„Vi”, antigenul „Vi” se supune unui fenomen de aglutinare de tip granular. Prezența antigenului „Vi” imprimă inaglutinabilitatea „O” tulpinilor care-l posedă. Fenomenul „O”-inaglutinabilității tulpinilor bogate în antigen „Vi” poate fi interpretat fizico-chimic ca rezultat al competiției între antigenele de suprafață cu sarcină electrică diferită.

Antigenul „Vi” nu suferă variații de fază; el suferă schimbări de ordin cantitativ: forma „V”, bogată în antigen „Vi” și „O”-inaglutinabilă; forma „W”, lipsită de antigen „Vi” și „O”-aglutinabilă; forme intermediare „V-W”, care sînt „Vi” și „O”-aglutinabile.

Agentul ,,Vi'' a fost descris și la alte salmonele: *S. paratyphi A.*, *S. paratyphi B.*, *S. typhimurium*, *S. paratyphi C.*, *S. newport*, *S. enteritidis.*

Antigenul ,,5'' este deosebit serologic și biochimic, atît de antigenul ,,Vi'', cît și cel ,,O''. El joacă însă rol de antigen-,,Vi'' la *S. paratyphi B.* și *S. typhimurium.*

Antigenul ,,*M*'' se întîlnește la mai multe tipuri serologice de *Salmonella,* care prezintă forme mucoide. Este de natură polizaharidică.

Sub influența a diferiți factori pot apărea mutante cu structură antigenică modificată.

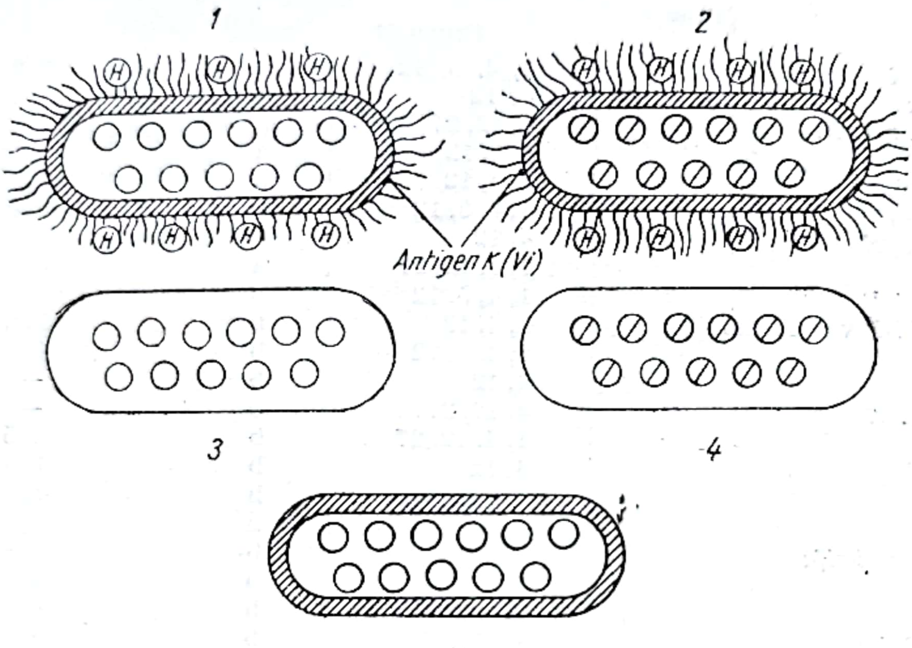


Fig. 101. — Dispoziţia antigenelor la *S. typhi* în raport cu structura citologică și cu forma de cultură.

1 – *S. typhi*, mobilă, în formă ,,S'' cu antigen somatic ,,O'', flagelar ,,H'', de înveliș ,,Vi''. *2* – *S. typhi*, mobilă, în formă ,,R'', cu antigen somatic modificat ,,Ø'', flagelar ,,H'', de înveliș ,,Vi''. *3* – *S. typhy*, imobilă, în formă ,,S'', cu antigen somatic ,,O'' și lipsită de antigen ,,Vi''. *4* – *S. typhi* imobilă, în formă ,,R'', cu antigen somatic modificat ,,O'', lipsită de antigen ,,Vi''. *5* – *S. typhi* imobilă, în formă ,,S'', cu antigen ,,Vi''.

Astfel sînt: mutante imobile, lipsite de antigene flagelare (de exemplu *S. typhi* $O_{9,11}$); forme ,,W'' de *S. typhi*, lipsite de antigen ,,Vi''; forme ,,R'' cu antigen ,,Ø'', și chiar mutante fără antigen ,,O'' (tulpina *S. typhi* Ty_6 S).

Prezentăm în mod schematic repartizarea antigenelor în raport cu structura morfologică a *S. typhi* în forma ,,S'' și în formele ,,R'', ciliate sau neciliate.

Pe baza principalelor fracțiuni antigenice, Kauffmann și White au întocmit o schemă antigenică de diagnostic, în care fiecare specie este etichetată cu o formulă antigenică proprie.

În raport cu conținutul lor în fracțiuni antigenice somatice, tipurile de *Salmonella* au fost împărțite în grupe, notate cu literele majuscule ale alfabetului (A,B,C, etc.).

În schemă fracțiunile antigenice somatice sînt desemnate cu cifre arabe; fracțiunile antigenice ,,H'', de fază specifică, cu literele mici ale alfabetului și cu litera *z* purtînd diferiți exponenți numerici, iar fracțiunile ,,H'', de fază nespecifică, cu cifre arabe sau grupările ,,enx'', ,,enz'', ,,lw'' etc.

Tabelul XXXVIII

Schema antigenică de diagnostic Kauffman-White

Specii	Antigen somatic	Antigen flagelar	
		Faza 1	Faza 2
Grupa A			
S. paratyphi-A	1, 2, 12	a	—
S. paratyphi-A var. durazzo	2, 12	a	—
S. kiel	1, 2, 12	g, p	—
Grupa B			
S. kisangani	1, 4, 5, 12	a	1, 2
S. hessarek	4, 12	a	1, 5
S. hessarek-var. 27	4, 12, 27	a	1, 5
S. fulica	4, 5, 12	a	1, 5
S. arechavaleta	4, 5, 12	a	1, 7
S. bispebjerg	1, 4, 5, 12	a	e, n, x
S. abortus equi	4, 12	—	e, n, x
S. tinda	1, 4, 12, 27	a	e, n, z_{15}
S. paratyphi-B	1, 4, 5, 12	b	1, 2
S. paratyphi-B var. *odense*	1, 4, 12	b	1, 2
S. java	1, 4, 5, 12	b	[1, 2]
S. sofia	4, 12	b	—
S. sofia var. 27	4, 12, 27	b	—
S. limete	1, 4, 12, 27	b	1, 5
S. canada	4, 12	b	1, 6
S. uppsala	4, 12, 27	b	1, 7
S. abony	1, 4, 5, 12	b	e, n, x
S. abony var. haifa	4, 12	b	e, n, x
S. abortus bovis	1, 4, 12, 27	b	e, n, x
S. wagenia	1, 4, 12, 27	b	e, n, z_{15}
S. schleissheim	4, 12, 27	b	—
S. wien	1, 4, 12	b	l, w
S. legon	4, 12	c	1, 5
S. abortus ovis	4, 12	c	1, 6
S. altendorf	4, 12	c	1, 7
S. womba	4, 12, 27	c	1, 7
S. jericho	1, 4, 12, 27	c	e, n, z_{15}
S. bury	4, 12, 27	c	z_6
S. stanley	4, 5, 12	d	1, 2
S. cairo	1, 4, 12, 27	d	1, 2
S. eppendorf	1, 4, 12, 27	d	1, 7
S. schwarzengrund	1, 4, 12, 27	d	e, n, x
S. sarajane	4, 12, 27	d	e, n, x
S. duisburg	4, 12	d	e, n, z_{15}
S. duisburg var. 27	1, 4, 12, 27	d	e, n, z_{15}
S. saliratis	4, 12	d, e, h	d, e, n, z_{15}
S. mons	1, 4, 12	d	l, w
S. ayinde	4, 12, 27	d	z_6
S. saint-paul	1, 4, 5, 12	e, h	1, 2
S. reading	4, 5, 12	e, h	1, 5
S. kaapstad	4, 12	e, h	1, 7
S. chester	4, 5, 12	e, h	e, n, x
S. san-diego	4, 5, 12	e, h	e, n, z_{15}
**S. makumira*	4, 12	e, n, x	1, 7
S. derby	1, 4, 5, 12	f, g	—
S. agona	4, 12	f, g, s	—
S. essen	4, 12	g, m	—
**S. caledon*	4, 12	g, m	e, n, x
S. halo	4, 5, 12	g, m, s	—

Tabelul XXXVIII (continuare)

Specii	Antigen somatic	Antigen flagelar	
		Faza 1	Faza 2
S. travis	4, 5, 12	g, (p), z_{51}	1, 7
S. kingston	1, 4, 12, 27	g, s, t	—
S. kingston var. copenhagen	4, 12	g, s, t	—
S. budapest	1, 4, 12	g, t	—
S. bechuana	4, 12, 27	g, t	—
S. california	4, 5, 12	m, t	—
S. typhi-murium	1, 4, 5, 12	i	1, 2
S. typhi-murium var. copenhagen	1, 4, 12	i	1, 2
S. agama	4, 12	i	1, 6
S. gloucester	1, 4, 12 (27)	i	l, w
S. neumeunster	1, 4, 12, 27	k	1, 6
S. texas	4, 5, 12	k	e, n, z_{15}
S. azteca	4, 5, 12	l, v	1, 5
S. bredeney	1, 4, 12, 27	l, v	1, 7
S. kimuenza	1, 4, 12, 27	l, v	e, n, x
S. brandenburg	4, 12	l, v	e, n, z_{15}
* *S. kilwa*	4, 12	l, w	e, n, x
S. vom	4, 12, 27	l, z_{13}, z_{28}	e, n, z_{15}
S. kunduchi	1, 4, 12, 27	l, z_{28}	1, 2
S. heidelberg	1, 4, 5, 12	r	1, 2
S. bradford	4, 12, 27	r	1, 5
S. remo	1, 4, 12, 27	r	1, 7
S. africana	4, 12	r (i)	l, w
S. coeln	4, 5, 12	y	1, 2
S. teddington	4, 12, 27	y	1, 7
S. ruki	4, 5, 12	y	e, n, x
S. ball	1, 4, 12, 27	y	e, n, x
S. jos	1, 4, 12, 27	y	e, n, z_{15}
S. kamoru	4, 12, 27	y	z_6
S. shubra	4, 5, 12	z	1, 2
S. kiambu	4, 12	z	1, 5
S. indiana	1, 4, 12	z	1, 7
* *S. nordenham*	1, 4, 12, 27	z	e, n, x
S. preston	1, 4, 12	z	l, w
S. entebbe	1, 4, 12, 27	z	z_6
S. stanleyville	1, 4, 5, 12	z_4 z_{23}	[1, 2]
S. jaja	4, 12, 27	z_4 z_{23}	—
S. kalamu	4, 12	z_4 z_{24}	—
S. haifa	1, 4, 5, 12	z_{10}	1, 2
S. ituri	1, 4, 12	z_{10}	1, 5
S. tudu	4, 12	z_{10}	1, 6
S. albert	4, 12	z_{10}	e, n, x
S. fortune	4, 12, 27	z_{10}	z_6
S. brancaster	1, 4, 12, 27	z_{29}	—
S. tafo	1, 4, 12, 27	z_{35}	1, 7
S. tejas	4, 12	z_{36}	—
S. wilhelmsburg	4, 12, 27	z_{38}	—
* *S. durbanville*	4, 12	z_{39}	1, 5, 7
Grupa C_1			
S. san-juan	6, 7	a	1, 5
S. umhlali	6, 7	a	1, 6
S. austin	6, 7	a	1, 7
S. oslo	6, 7	a	e, n, x
S. denver	6, 7	a	e, n, z_{15}
S. coleypark	6, 7	a	l, w
* *S. calvinia*	6, 7	a	z_{24}

Specii	Antigen somatic	Antigen flagelar	
		Faza 1	Faza 2
S. brazzaville	6, 7	b	1, 2
S. edinburg	6, 7	b	1, 5
S. georgia	6, 7	b	e, n, z_{15}
S. ohio	6, 7	b	l, w
S. leopoldville	6, 7	b	z_6
S. kotte	6, 7	b	z_{35}
**S. bloemfontein*	6, 7	b	z_{42}
S. paratyphi C	6, 7, Vi	c	1, 5
S. cholerae-suis	6, 7	c	1, 5
S. typhi-suis	6, 7	c	1, 5
S. decatur	6, 7	c	1, 5
S. birkenhead	6, 7	c	1, 6
S. mission	6, 7	d	1, 5
S. isangi	6, 7	d	1, 5
S. kivu	6, 7	d	1, 6
S. amersfoort	6, 7	d	e, n, x
S. gombe	6, 7	d	e, n, z_{15}
S. livingstone	6, 7	d	l, w
S. wil	6, 7	d	l, z_{13}, z_{28}
S. larochelle	6, 7	e, h	1, 2
S. lomita	6, 7	e, h	1, 5
S. norwich	6, 7	e, h	1, 6
S. braenderup	6, 7	e, h	e, n, z_{15}
S. rissen	6, 7	f, g	—
✓ *S. montevideo*	6, 7	g, m, s	—
S. othmarschen	6, 7	g, m, t	—
S. alamo	6, 7	g, (p), z_{51}	1, 5
S. menston	6, 7	g, s, t	—
S. riggil	6, 7	g, t	—
S. haelsingborg	6, 7	m, p. t, u	—
✓ *S. oranienburg*	6, 7	m, t	—
S. oritamerin	6, 7	i	1, 5
S. garoli	6, 7	i	1, 6
S. norton	6, 7	i	l, w
S. galiema	6, 7	k	1, 2
✓ *S. thompson*	6, 7	k	1, 5
S. daytona	6, 7	k	1, 6
S. singapore	6, 7	k	e, n, x
S. escanaba	6,7	k	e, n, z_{15}
S. concord	6, 7	l, v	1, 2
S. irumu	6, 7	l, v	1, 5
S. bonn	6, 7	l, v	e, n, x
S. potsdam	6, 7	l, v	e, n, z_{15}
S. gdansk	6,7	l, v	z_6
S. colorado	6, 7	l, w	1, 5
S. ness-ziona	6, 7	l, z_{13}	1, 5
S. kenya	6, 7	l, z_{13}	e, n, x
S. neukoelln	6, 7	l, z_{13}, z_{28}	e, n, z_{15}
S. makiso	6, 7	l, z_{13}, z_{28}	e, n, z_{15}
**S. heilbron*	6, 7	l, z_{28}	1, 5
S. virchow	6, 7	r	1, 2
S. infantis	6, 7	r	1, 5
S. nigeria	6, 7	r	1,6
S. colindale	6, 7	r	1, 7
S. papuana	6, 7	r	e, n, z_{15}
S. richmond	6, 7	y	1, 2
✓ *S. bareilly*	6, 7	y	1, 5

Tabelul XXXVIII (continuare)

Specii	Antigen somatic	Antigen flagelar	
		Faza 1	Faza 2
S. gatow	6, 7	y	1, 7
S. hartford	6, 7	y	e, n, x
S. mikawasima	6, 7	y	e, n, z_{15}
**S. tosamanga*	6, 7	z	1, 5
S. businga	6, 7	z	e, n, z_{15}
S. aequatoria	6, 7	z_4, z_{23}	e, n, z_{15}
S. inganda	6, 7	z_{10}	1, 5
S. eschweiler	6, 7	z_{10}	1, 6
S. djugu	6, 7	z_{10}	e, n, x
S. mabandaka	6, 7	z_{10}	e, n, z_{15}
S. tennessee	6, 7	z_{29}	—
**S. bacongo*	6, 7	z_{36}	z_{42}
S. lille	6, 7	z_{38}	—
**S. gilbert*	6, 7	z_{39}	1, 7
S. hillsborough	6, 7	z_{41}	l, w
**S. sullivan*	6, 7	z_{42}	1, 7

Grupa C_2

Specii	Antigen somatic	Faza 1	Faza 2
S. curacao	6, 8	a	1, 6
S. narashino	6, 8	a	e, n, x
S. leith	6, 8	a	e, n, z_{15}
**S. tulear*	6, 8	a	z_{52}
S. nagoya	6, 8	b	1,5
S. stourbridge	6, 8	b	1, 6
S. gatuni	6, 8	b	e, n, x
S. bukuru	6, 8	b	l, w
S. banalia	6, 8	b	z_6
S. wingrove	6, 8	c	1, 2
S. utah	6, 8	c	1, 5
S. bronx	6, 8	c	1, 6
S. belem	6, 8	c	e, n, x
S. quiniela	6, 8	c	e, n, z_{15}
S. muenchen	6, 8	d	1, 2
S. manhattan	6, 8	d	1, 5
S. sterrenbos	6, 8	d	e, n, x
S. labadi	6, 8	d	z_6
S. newport	6, 8	e, h	1, 2
S. kottbus	6, 8	e, h	1, 5
S. tshiongwe	6, 8	e, h	e, n, z_{15}
S. chincol	6, 8	g, m, s	e, n, x
**S. baragwanath*	6, 8	m, t	1, 5
**S. germiston*	6, 8	m, t	e, n, x
S. lindenburg	6, 8	i	1, 2
S. takoradi	6, 8	i	1, 5
S. bonariensis	6, 8	i	e, n, x
S. aba	6, 8	i	e, n, z_{15}
S. blockley	6, 8	k	1, 5
S. litchfield	6, 8	l, v	1, 2
S. manchester	6, 8	l, v	1, 7
S. holcomb	6, 8	l, v	e, n, z_{15}
S. edmonton	6, 8	l, v	e, n, z_{15}
S. fayed	6, 8	l, w	1, 2
S. bovis-morbificans	6, 8	r	1, 5
S. akanji	6, 8	r	1, 7
S. hidalgo	6, 8	r	e, n, z_{15}
S. gold-coast	6, 8	r	l, w
S. tananarive	6, 8	y	1, 5

Specii	Antigen somatic	Antigen flagelar	
		Faza 1	Faza 2
S. alagbon	6, 8	y	1, 7
S. praha	6, 8	y	e, n, z_{15}
S. kuru	6, 8	z	l, w
S. chailey	6, 8	z_4, z_{23}	e, n, z_{15}
S. duesseldorf	6, 8	z_4, z_{24}	—
S. tallagassee	6, 8	z_4, z_{32}	— —
S. mapo	6, 8	z_{10}	1, 5
S. hadar	6, 8	z_{10}	e, n, x
S. glostrup	6, 8	z_{10}	e, n, z,$_{15}$
S wippra	6, 8	z_{10}	z_6
S. uno	6, 8	z_{29}	—
		Grupa C_3	
S. sanga	(8)	b	1, 7
S. shipley	(8), 20	b	e, n, z_{13}
S. virginia	(8)	d	1, 2
S. emek	(8), 20	g, m, s	—
S. kentucky	(8), 20	i	z_6
S. kentucky var.	(8)	i	z_6
S. amherstiana	(8)	l, v	1, 6
S. hindmarsh	(8)	r	1, 5
S. pikine	(8), 20	r	z_6
S. altona	(8), 20	r (i)	z_6
S. brunei	(8), 20	y	
S. kralingen	(8), 20	y	
S. corvallis	(8), 20	z_4, z_{23}	—
S. albany	(8), 20	z_4, z_{24}	—
S. molade	(8), 20	z_{10}	z_6
S. tamale	(8), 20	z_{29}	—
		Grupa C_4	
S. kaduna	6, (7), (14)	c	e, n, z_{15}
S. eimsbuettel	6, (7), (14)	d	l, w
S. ardwick	6, (7), (14)	f, g	—
S. gelsenkirchen	6, (7), (14)	l, v	z_3
S. jerusalem	6, (7), (14)	z_{10}	l, w
S. bornum	6, (7), (14)	z_{38}	—
		Grupa D_1	
S. sendai	1, 9, 12	a	1, 5
S. miami	1, 9, 12	a	1, 5
S. (wuerzburg, S. bambesa) S. os	9, 12	a	1, 6
S. saarbruecken	1, 9, 12	a	1, 7
S. loma-linda	9, 12	a	e, n, x
S. durban	9, 12	a	e, n, z_{15}
S. onarimon	1, 9, 12	b	1, 2
S. frintrop	1, 9, 12	b	1, 5
**S. mjimwema*	1, 9, 12	b	e, n, x
**S. blankenese*	1, 9, 12	b	z_6
S. goeteborg	9, 12	c	1, 5
S. ipeko	9, 12	c	1, 6
S. alabama	9, 12	c	e, n, z_{15}
S. ridge	9, 12	c	z_6
**S. zuerich*	1, 9, 12	c	z_{39}
S. typhi	9, 12, Vi	d	—
S. ndolo	9, 12	d	1, 5

Tabelul XXXVIII (continuare)

Specii	Antigen somatic	Antigen flagelar	
		Faza 1	Faza 2
S. tarshyne	9, 12	d	1, 6
S. zega	9, 12	d	z_6
S. jaffna	1, 9, 12	d	z_{35}
S. eastbourne	1, 9, 12	e, h	1, 5
S. israel	9, 12	e, h	e, n, z_{15}
**S. lindrick*	9, 12	e, n, x	1, 5, 7
**S. lindrick var.* 1, 7	9, 12	e, n, x	1, 7
S. berla	9, 12	f, g, t	—
S. enteritidis	1, 9, 12	g, m	—
S. blegdam	9, 12	g, m, q	—
**S. kuilsrivier*	9, 12	g, m, s, t	e, n, x
**S. manica*	1, 9, 12	g, m, s, t	z_{42}
S. dublin	1, 9, 12	g, p	—
S. naestved	1, 9, 12	g, p, s	—
S. rostock	1, 9, 12	g, p, u	—
S. new-mexico	9, 12	g, (p), z_{51}	1, 5
S. moscow	9, 12	g, q	—
**S. neasden*	9, 12	g, s, t	e, n, x
**S. hamburg*	1, 9, 12	g, t	—
S. pensacola	9, 12	m, t	—
S. seremban	9, 12	i	1, 5
S. claibornei	1, 9, 12	k	1, 5
S. mendoza	9, 12	l, v	1, 2
S. panama	1, 9, 12	l, v	1, 5
S. kapemba	9, 12	l, v	1, 7
S. goettingen	9, 12	l, v	e, n, z_{15}
S. victoria	1, 9, 12	l, w	1, 5
**S. dar-es-salaam*	1, 9, 12	l, w	e, n, x
S. miyazaki	9, 12	l, z_{13}	1, 7
S. napoli	1, 9, 12	l, z_{13}	e, n, x
S. javiana	1, 9, 12	l, z_{28}	1, 5
S. jamaica	9, 12	r	1, 5
S. lawndale	1, 9, 12	z	1, 5
**S. stellenbosch*	1, 9, 12	z	1, 7
**S. angola*	1, 9, 12	z	z_6
**S. hueningen*	9, 12	z	z_{39}
**S. wangata*	1, 9, 12	z_4, z_{23}	[1, 7]
S. portland	9, 12	z_{10}	1, 5
**S. canastel*	9, 12	z_{29}	1, 5
S. penarth	9, 12	z_{35}	z_6
**S. wynberg*	1, 9, 12	z_{39}	1, 7
S. gallinarum-pullorum	1, 9, 12	—	—
Grupa D_2			
S. baildon	(9), 46	a	e, n, x
S. zadar	(9), 46	b	1, 6
**S. lundby*	(9), 46	b	e, n, x
S. bamboye	(9), 46	b	l, w
S. itutaba	(9), 46	c	z_6
S. strasbourg	(9), 46	d	1, 7
S. plymouth	(9), 46	d	z_6
S. bergedorf	(9), 46	e, h	1, 2
S. wernigerode	(9), 46	f, g	—
S. gateshead	(9), 46	g, s, t	—
S. mathura	(9), 46	i	e, n, z_{15}
S. marylebone	(9), 46	k	1, 2
S. ceyco	(9), 46	k	z_{35}

Specii	Antigen somatic	Antigen flagelar	
		Faza 1	Faza 2
S. shoreditch	(8), 46	r	e, n, z_{15}
**S. haarlem*	(9), 46	z	e, n, x
S. ekotedo	(9), 46	z_4, z_{23}	—
S. lishabi	(9), 46	z_{10}	1, 7
S. ouakam	(9), 46	z_{29}	—
S. fresno	(9), 12, 46	z_{38}	—
	Grupa E_1		
S. aminatu	3, 10	a	1, 2
S. oxford	3, 10	a	1, 7
S. kalina	3, 10	b	1, 2
S. butantan	3, 10	b	1, 5
S. huvudsta	3, 10	b	1, 7
S. benfica	3, 10	b	e, n, x
S. yaba	3, 10	b	e, n, z_{15}
S. epicrates	3, 10	b	1, w
S. pramiso	3, 10	c	1,7
S. anderlecht	3, 10	c	l, w
S. okefoko	3, 10	c	z_6
S. shangani	3, 10	d	1, 5
S. onireke	3, 10	d	1, 7
S. souza	3, 10	d	e, n, x
S. birmingham	3, 10	d	l, w
S. weybridge	3, 10	d	z_6
S. maron	3, 10	d	z_{35}
S. vejle	3, 10	e, h	1, 2
S. muenster	3, 10	e, h	1, 5
√*S. anatum*	3, 10	e, h	1, 6
S. nyborg	3, 10	e, h	1, 7
S. newlands	3, 10	e, h	e, n, x
√*S. meleagridis*	3, 10	e, h	l, w
S. sekondi	3, 10	e, h	z_6
**S. chudleigh*	3, 10	e, n, x	1, 7
S. suberu	3, 10	g, m	—
S. amsterdam	3, 10	g, m, s	—
S. westhampton	3, 10	g, s, t	—
**S. islington*	3, 10	g, t	—
S. falkensee	3, 10	i	e, n, z_{15}
S. zanzibar	3, 10	k	1, 5
S. new-rochelle	3, 10	k	l, w
S. nchanga	3, 10	l, v	1, 2
√*S. sinstorf*	3, 10	l, v	1, 5
√*S. london*	3, 10	l, v	1, 6
√*S. give*	3, 10	l, v	1, 7
S. ruzizi	3, 10	l, v	e, n, z_{15}
**S. fuhlsbuettel*	3, 10	l, v	z_6
S. uganda	3, 10	l, z_{13}	1, 5
S. fallowfield	3, 10	l, z_{13}, z_{28}	e, n, z_{15}
**S. westpark*	3, 10	l, z_{28}	e, n, x
S. seegefeld	3, 10	r (i)	1, 2
S. elisabethville	3, 10	r	1, 7
S. simi	3, 10	r	e, n, z_{15}
S. weltevreden	3, 10	r	z_6
S. amager	3, 10	y	1, 2
S. orion	3, 10	y	1, 5
S. mokola	3, 10	y	1, 7

Tabelul XXXVIII (continuare)

Specii	Antigen somatic	Antigen flagelar	
		Faza 1	Faza 2
S. ohlstedt	3, 10	y	e, n, x
S. bolton	3, 10	y	e, n, z_{15}
S. stockholm	3, 10	y	z_6
**S. alexander*	3, 10	z	1, 5
**S. finchley*	3, 10	z	e, n, x
S. clerkenwell	3, 10	z	l, w
S. adabraka	3, 10	z_4, z_{23}	1, 7
S. okerara	3, 10	z_{10}	1, 2
S. lexington	3, 10	z_{10}	1, 5
S. coquilhatville	3, 10	z_{10}	1, 7
S. kristianstad	3, 10	z_{10}	e, n, z_{15}
S. jedburgh	3, 10	z_{29}	—
S. cairina	3, 10	z_{35}	z_6
S. macallen	3, 10	z_{36}	—
S. bolombo	3, 10	z_{38}	—
**S. mpila*	3, 10	z_{38}	z_{42}
**S. winchester*	3, 10	z_{39}	1, 7
	Grupa E_2		
S. rosenthal	3, 15	b	1, 5
S. pankow	3, 15	d	1, 5
S. goerlitz	3, 15	e, h	1, 2
S. new-haw	3, 15	e, h	1, 5
S. newington	3, 15	e, h	1, 6
S. selandia	3, 15	e, h	1, 7
S. cambridge	3, 15	e, h	l, w
S. drypool	3, 15	g, m, s	—
**S parow*	3, 15	g, m, s, t	—
S. halmstad	3, 15	g, s, t	—
S. portsmouth	3, 15	l, v	1, 6
S. new-brunswick	3, 15	l, v	1, 7
S. kinshasa	3, 15	l, z_{13}	1,5
S. lanka	3, 15	r	z_6
S. tuebingen	3, 15	y	1, 2
S. binza	3, 15	y	1, 5
S. tournai	3, 15	y	z_6
S. manila	3, 15	z_{10}	1, 5
	Grupa E_3		
S. arkansas	(3), (15), 34	e, h	1, 5
S. minneapolis	(3), (15), 34	e, h	1, 6
S. wildwood	(3), (15), 34	e, h	l, w
S. canoga	(3), (15), 34	g, s, t	—
S. menhaden	(3), (15), 34	l, v	1, 7
S. thomasville	(3), (15), 34	y	1, 5
S. illinois	(3), (15), 34	z_{10}	1, 5
S. harrisonburg	(3), (15), 34	z_{10}	1, 5
	Grupa E_4		
S. gwoza	1, 3, 19	a	e, n, z_{15}
S. broughton	1, 3, 19	b	1, w
S. accra	1, 3,1 9	b	z_6
S. ahmadi	1, 3,1 9	d	1, 5
S. liverpool	1, 3, 19	d	e, n, z_{15}
S. tilburg	1, 3, 19	d	1, w

Specii	Antigen somatic	Antigen flagelar	
		Faza 1	Faza 2
S. niloese	1, 3, 19	d	z_6
S. calabar	1, 3, 19	e, h	l, w
S. maiduguri	1, 3, 19	f, g, t	e, n, z_{15}
v *S. senftenberg*	1, 3, 19	g, s, t	—
S. taksony	1, 3, 19	i	z_6
S. ngor	1, 3, 19	l, v	1, 5
S. westerstede	1, 3, 19	l, z_{13}	—
S. lokstedt	1, 3, 19	l, z_{13}, z_{28}	1, 2
S. bedford	1, 3, 19	l, z_{13}, z_{28}	e, n, z_{15}
S. yalding	1, 3, 19	r	e, n, z_{15}
S. krefeld	1, 3, 19	y	l, w
S. korlebu	1, 3, 19	z	1, 5
S. schoeneberg	1, 3, 19	z	e, n, z_{15}
S. carno	1, 3, 19	z	l, w
S. llandoff	1, 3, 19	z_{29}	—
S. chittagong	(1), 3, 10, (19)	b	z_{35}
S. ilugun	(1), 3, 10 (19)	z_4, z_{23}	z_6
S. dessau	(1), 3, 15, (19)	g, s, t	—

Grupa F

S. marseille	11	a	1, 5
S. luciana	11	a	e, n, z_{15}
S. leeuwarden	11	b	1, 5
S. pharr	11	b	e, n, z_{15}
S. chandans	11	d	e, n, x
**S. montgomery*	11	d (a)	d, e, n, z_{15}
S. chingola	11	e, h	1, 2
S. adamstua	11	e, h	1, 6
S. redhill	11	e, h	l, z_{13}, z_{28}
**S. grabouw*	11	g, m, s, t	z_{39}
**S. lincoln*	11	m, t	e, n, x
S. aberdeen	11	i	1, 2
S. brijbhumi	11	i	1, 5
S. heerlen	11	i	1, 6
S. veneziana	11	i	e, n, x
S. pretoria	11	k	1, 2
S. abaetetuba	11	k	1, 5
S. kisarawe	11	k	e, n, x
S. stendal	11	l, v	1, 2
S. maracaibo	11	l, v	1, 5
S. fann	11	l, v	e, n, x
S. osnabrueck	11	l, z_{13}, z_{28}	e, n, x
**S. huila*	11	l, z_{28}	e, n, x
S. senegal	11	r	1, 5
S. rubislaw	11	r	e, n, x
S. volta	11	r	l, z_{13}, z_{28}
S. solt	11	y	1, 5
S. nyanza	11	z	z_6
**S. parera*	11	z_4, z_{23}	—
S. wentworth	11	z_{10}	1, 2
S. straengnaes	11	z_{10}	1, 5
S. tel-hashomer	11	z_{10}	e, n, x
S. maastricht	11	z_{41}	1, 2

Tabelul XXXVIII (continuare)

Specii	Antigen somatic	Antigen flagelar	
		Faza 1	Faza 2
Grupa G_1			
S. mim	13, 22	a	1, 6
S. ibadan	13, 22	b	1, 5
S. bahati	13, 22	b	e, n, z_{15}
S. friedenau	13, 22	d	1, 6
S. willemstad	1, 13, 22	e, h	1, 6
S. bron	13, 22	g, m	e, n, z_{15}
**S. limbe*	13, 22	g, m, t	—
**S. rotterdam*	1, 13,22	g, t	1, 5
S. tanger	1, 13, 22	y	1, 6
S. poona	13, 22	z	1, 6
S. poona var. 37	1, 13, 22	z	1, 6
S. bristol	13, 22	z	1, 7
S. roodepoort	13, 22	z_{10}	1, 5
**S. clifton*	13, 22	z_{29}	1, 5
**S. goodwood*	13, 22	z_{29}	e, n, x
S. mampong	13, 22	z_{35}	1, 6
Grupa G_2			
S. shagoua	1, 13, 23	a	1, 5
S. mississippi	1, 13, 23	b	1, 5
S. atlanta	13,23	b	—
S. bracknell	13, 23	b	1, 6
S. durham	13,23	b	e, n, z_{15}
**S. acres*	1, 13, 23	b	z_{42}
S. mishmar-haemek	1, 13, 23	d	1, 5
S. grumpensis	13, 23	d	1, 7
S. tel-el-kebir	13, 23	d	e, n, z_{15}
S. wichita	1, 13, 23	d	—
S. putten	13, 23	d	l, w
S. isuge	13, 23	d	z_6
S. havana	1, 13, 23	f, g	—
S. agbeni	13, 23	g, m	—
S. okatie	13, 23	g, s, t	—
**S. luanshya*	13, 23	g, s (t)	—
S. congo	13, 23	g, t	—
**S. gojenberg*	1, 13, 23	g, t	1, 5
**S. katesgrove*	1, 13, 23	m, t	1, 5
**S. worcester*	1, 13, 23	m, t	e, n, x
S. kintambo	13, 23	m, t	—
S. idikan	13, 23	i	1, 5
S. jukestown	13, 23	i	e, n, z_{15}
S. linton	13, 23	r	e, n, z_{15}
S. tunis	1, 13, 23	y	z_6
**S. nachshonim*	1, 13, 23	z	1, 5
S. worthington	1, 13, 23	z	l, w
S. ajiobo	13, 23	z_4, z_{23}	—
S. demerara	13, 23	z_{10}	l, w
S. cubana	1, 13, 23	z_{29}	—
S. fanti	13, 23	z_{38}	—
* *S. stevenage*	1, 13, 23	z_{42}	1, 7
Grupa II			
S. garba	1, 6, 14, 25	a	1, 5
S. ferlac	1, 6, 14, 25	a	e, n, x
S. tucson	1, 6, 14, 25	b	—

Tabelul XXXVIII (continuare)

Specii	Antigen somatic	Antigen flagelar	
		Faza 1	Faza 2
S. blijdorp	1, 6, 14,25	c	1, 5
S. heves	6, 14, 24	d	1, 5
S. finkenwerder	1, 6, 14, 25	d	1, 5
S. florida	1, 6, 14, 25	d	1, 7
S. lindern	6, 14, 24	d	e, n, x
S. charity	1, 6, 14, 25	d	e, n, x
S. teko	1, 6, 14, 25	d	e, n, z_{15}
S. albuquerque	1, 6, 14, 24	d	z_6
S. bahrenfeld	6, 14, 24	e, h	1, 5
S. onderstepoort	1, 6, 14, 26	e, h	1, 5
S, magumeri	1, 6, 14, 25	e, h	1, 6
S. warragul	1, 6, 14, 25	g, m	—
S. caracas	1, 6, 14, 25	g, m, s	—
S. kaitaan	1, 6, 14, 25	m, t	—
S. mampeza	1, 6, 14, 25	i	1, 5
S. buzu	1, 6, 14, 25	i	1, 7
S. schalkwijk	(6), 14, (24)	i	e, n
S. harburg	1, 6, 14, 25	k	1, 5
S. boecker	6, 14	l, v	1, 7
S. horsham	1, 6, 14, 25	l, v	e, n, x
S. surat	1, 6, 14, 25	r (i)	e, n, z_{15}
S. carrau	6, 14, 24	y	1, 7
S. madelia	1, 6, 14, 25	y	1, 7
S. fischerkietz	1, 6, 14, 25	y	e, n, x
S. homosassa	1, 6, 14, 25	z	1, 5
S. soahanina	6, 14, 24	z	e, n, x
S. sundsvall	1, 6, 14, 25	z	e, n, x
S. uzaramo	1, 6, 14, 25	z_4, z_{24}	—
	Grupa I		
S. hannover	16	a	1, 2
S. brazil	16	a	1, 5
S. amunigun	16	a	1, 6
S. fischerhuette	16	a	e, n, z_{15}
S. heron	16	a	z_6
S. hull	16	b	1, 2
S. wa	16	b	1, 5
S. glasgow	16	b	1, 6
S. hvittingfoss	16	b	e, n, x
S. malstatt	16	b	z_6
S. vancouver	16	c	1, 5
S. shamba	16	c	e, n, x
S. oldenburg	16	d	1, 2
S. gaminara	16	d	1,7
S. nottingham	16	d	e, n, z_{15}
S. barmbek	16	d	z_6
S. weston	16	e, h	z_6
**S. bellville*	16	e, n, x	1, 7
**S. adeoyo*	16	g, m	—
**S. mobeni*	16	g, m, s, t	—
**S. merseyside*	16	g, t	1, 5
**S. rowbarton*	16	m, t	—
S. amina	16	i	1, 5
S. frankfurt	16	i	e, n, z_{15}
S. szentes	16	k	1, 2
S. orientalis	16	k	e, n, z_{15}

Tabelul XXXVIII (continuare)

Specii	Antigen somatic	Antigen flagelar	
		Faza 1	Faza 2
S. shanghai	16	l, v	1, 6
S. welikade	16	l, v	1, 7
S. salford	16	l, v	e, n, x
S. burgas	16	l, v	e, n, z_{15}
S. saphra	16	y	1, 5
S. akuafo	16	y	1, 6
S. kikoma	16	y	e, n, x
**S. haddon*	16	z_4, z_{23}	—
S. lisboa	16	z_{10}	1, 6
S. redlands	16	z_{10}	e, n, z_{15}
**S. jacksonville*	16	z_{29}	—
**S. woodstock*	16	z_{42}	1, (5), 7
**S. elsiesrivier*	16	z_{42}	1, 6
	Grupa J		
S. jangwani	17	a	1, 5
S. kinondoni	17	a	e, n, x
S. kirkee	17	b	1,2
**S. hillbrow*	17	b	e, n, x, z_{15}
S. victoriaborg	17	c	1, 6
S. berlin	17	d	1, 5
S. niamey	17	d	l, w
**S. verity*	17	e, n, x, z_{15}	1, 6
**S. bleadon*	17	f, g, t	[e, n, x, z_{15}]
S. irenea	17	k	1, 5
S. matadi	17	k	e, n, x
S. morotai	17	l, v	1, 2
S. michigan	17	l, v	1, 5
S. carmel	17	l, v	e, n, x
S. kandla	17	z_{29}	—
	Grupa K		
S. usumbura	18	d	1, 7
S. langenhorn	18	m, t	—
S. memphis	18	k	1, 5
S. cerro	18	z_4, z_{23}	—
S. siegburg	6, 14, 18	z_4, z_{23}	—
S. blukwa	18	z_4, z_{24}	—
**S. szeist*	18	z_{10}	z_6
**S. beloha*	18	z_6	—
	Grupa L		
S. assen	21	a	—
S. ghana	21	b	1, 6
S. minnesota	21	b	e, n, x
S. rhone	21	c	e, n, x
S. spartel	21	d	1, 5
S. magwa	21	d	e, n, x
S. ruiru	21	y	e, n, x
**S. soesterberg*	21	z_4, z_{23}	—
**S. gwaai*	21	z_4, z_{24}	—
**S. wandsbek*	21	z_{10}	z_6
S. gambaga	21	z_{35}	e, n, z_{15}

Tabelul XXXVIII (continuare)

Specii	Antigen somatic	Antigen flagelar	
		Faza 1	Faza 2
Grupa M			
S. solna	28	a	1, 5
S. dakar	28	a	1, 6
S. seattle	28	a	e, n, x
S. moëro	28	b	1, 5
S. ashanti	28	b	1, 6
S. bokanjac	28	b	1, 7
S. langford	28	b	e, n, z_{15}
* *S. kaltenhausen*	28	b	z_6
S. hermannswerder	28	c	1, 5
S. halle	28	c	1, 7
S. wedding	28	c	e, n, z_{16}
S. techimani	28	c	z_4
S. mundonobo	28	d	1, 7
S. mocamedes	28	d	e, n, x
S. patience	28	d	e, n, z_{15}
S. friederichsfelde	28	f, g	—
S. abadina	28	g, m	e, n, z_{16}
S. ona	28	g, s, t	—
S. vinohrady	28	m, t	—
S. kuessel	28	i	e, n, z_{15}
S. guilford	28	k	1, 2
S. ilala	28	k	1, 5
S. adamstown	28	k	1, 6
S. taunton	28	k	e, n, x
S. ank	28	k	e, n, z_{15}
S. leoben	28	l, v	1, 5
S. vitkin	28	l, v	e, n, x
S. nashua	28	l, v	e, n, z_{15}
S. chicago	28	r	1, 5
S. kibusi	28	r	e, n, x
S. nima	28	y	1, 5
S. pomona	28	y	1, 7
S tel-aviv	28	y	e, n, z_{15}
S. ezra	28	z	1, 7
S. brisbane	28	z	e, n, z_{15}
* *S. ceres*	28	z	z_{39}
S. babelsberg	28	z_4, z_{23}	e, n, z_{15}
S. umbilo	28	z_{10}	e, n, x
S. luckenwalde	28	z_{10}	e, n, z_{15}
S. moroto	28	z_{10}	l, w
S. aderike	28	z_{38}	—
Grupa N			
S. zehlendorf	30	a	1, 5
S. urbana	30	b	e, n, x
S. godesberg	30	g, m	—
S. wayne	30	g, (p), z_{51}	—
S. landau	30	i	1, 2
S. morehead	30	i	1, 5
S. soerenga	30	i	l, w
S. ramat-gan	30	k	1, 5
S. aqua	30	k	1, 6
S. angoda	30	k	e, n, x
S. odozi	30	k	e, n, x, z_{15}
S. donna	30	l, v	1, 5

Specii	Antigen somatic	Antigen flagelar	
		Faza 1	Faza 2
S. morocco	30	l, z_{13}, z_{28}	e, n, z_{15}
S. gege	30	r	1, 5
S. matopeni	30	y	1, 2
S. bodjonegonegoro	30	z_4, z_{24}	—
S. kumasi	30	z_{10}	e, n, z_{15}
Grupa O			
S. umhlatazana	35	a	e, n, z_{15}
S. tchad	35	b	—
S. yolo	35	c	—
S. adelaide	35	f, g	—
S. ealing	35	g, m, s	—
S. agodi	35	g, t	—
S. monschaui	35	m, t	—
S. gambia	35	i	e, n, z_{15}
S. massakory	35	r	l, w
S. alachua	35	z_4, z_{23}	—
S. westphalia	35	z_4, z_{24}	—
S. camberene	35	z_{10}	1, 5
S. ligna	35	z_{10}	z_6
Grupa P			
S. sheffield	38	c	1, 5
**S. carletonville*	38	d	—
S. thiaroye	38	e, h	1, 2
S. kasenyi	38	e, h	1, 5
S. korovi	38	g, m, s	—
S. foulpointe	38	g, t	—
S. mgulani	38	i	1, 2
S. lansing	38	i	1, 5
S. inverness	38	k	1, 6
S. roan	38	l, v	e, n, x
S. lindi	38	r	1, 5
S. emmastad	38	r	1, 6
S. freetown	38	y	1, 5
S. colombo	38	y	1, 6
S. perth	38	y	e, n, x
S. yoff	38	z_4, z_{23}	1, 2
Grupa Q			
S. wandsworth	39	b	1, 2
S. mara	39	e, h	—
S. hofit	39	i	1, 5
S. champaign	39	k	1, 5
S. kokomlemle	39	l, v	e, n, x
**S. mondeor*	39	l, z_{28}	e, n, x
S. anfo	39	y	1, 2
Grupa R			
S. shikmonah	40	a	1, 5
S. greiz	40	a	z_6
**S. springs*	40	a	z_{39}
S. riogrande	40	b	1, 5
S. johannesburg	1, 40	b	e, n, x
S. duval	1, 40	b	e, n, z_{15}

Tabelul XXXVIII (continuare)

Specii	Antigen somatic	Antigen flagelar	
		Faza 1	Faza 2
S. benguella	40	b	z_6
**S. suarez*	1, 40	c	e, n, x, z_{15}
S. driffield	1, 40	d	1, 5
S. tilene	1, 40	e, h	1, 2
**S. alsterdor*	1, 40	g, m, t	—
S. boksburg	40	g, s	e, n, z, z_{15}
S. allandale	1, 40	k	1, 6
S. milesi	1, 40	l, v	1, 2
S. bukavu	1, 40	l, z_{28}	1, 5
S. santhiaba	40	l, z_{28}	1, 6
**S. bulawayo*	1, 40	z	1, 5
S. nowawes	40	z	z_6
**S. sachsenwald*	1, 40	z_4, z_{23}	—
**S. degania*	40	z_4, z_{24}	—
**S. bern*	1,40	z_4, z_{32}	—
S. omifisan	40	z_{29}	—
**S. fandran*	1, 40	z_{35}	e, n, x, z_{15}
**S. grunty*	1, 40	z_{39}	1, 6
S. karamoja	1, 40	z_{41}	1, 2
	Grupa S		
S. vietnam	41	b	—
S. egusi	41	d	—
**S. lethe*	41	g, t	—
S. waycross	41	z_4, z_{23}	—
S. ipswich	41	z_4, z_{24}	—
**S. negev*	41	z_{10}	1, 2
S. leipzig	41	z_{10}	1, 5
S. inpraw	41	z_{10}	e, n, x
**S. lichtenberg*	41	z_{10}	z_6
S. offa	41	z_{38}	—
	Grupa T		
**S. chinovum*	42	b	1, 5
**S. uphill*	42	b	e, n, x, z_{16}
S. egusitoo	1, 42	b	z_6
S. kampala	1, 42	c	z_6
**S. fremantle*	42	(f), g, t	—
S. maricopa	1, 42	g, (p), z_{51}	1, 5
S. kaneshie	1, 42	i	l, w
**S. portbech*	42	l, v	e, n, x, z_{15}
**S. nairobi*	42	r	—
S. harvestehude	1, 42	y	z_6
**S. detroit*	42	z	1, 5
**S. eand*	42	z	e, n, x, z_{15}
S. loenga	1, 42	z_{10}	z_6
S. weslaco	42	z_{36}	—
	Grupă U		
S. berkeley	43	a	1, 5
S. milwaukee	43	f, g	—
S. mbao	43	i	1, 2

Tabelul XXXVIII (continuare)

Specii	Antigen somatic	Antigen flagelar	
		Faza 1	Faza 2
S. ahuza	43	k	1, 5
S. farcha	43	y	1, 2
S. kingabwa	43	y	1, 5
**S. houten*	43	z_4, z_{23}	—
S. tuindorp	43	z_4, z_{32}	—
S. irigni	43	z_{38}	—
**S. bunnik*	43	z_{42}	[1, 5, 7]
	Grupa V		
S. niarembe	44	a	l, w
S. fischerstrasse	44	d	e, n, z_{15}
S. vleuten	44	f, g	—
S. gamaba	44	g, m, s	—
S. uhlenhorst	44	z	l, w
S. christiansborg	44	z_4, z_{24}	—
S. guinea	44	z_{10}	—
	Grupa W		
**S. vrindaban*	45	a	e, n, x
**S. ejeda*	45	a	z_{10}
S. deversoir	45	c	e, n, x
S. dugbe	45	d	1, 6
S. karachi	45	d	e, n, x
S. suelldorf	45	f, g	—
S. tornow	45	g, m	—
**S. bremen*	45	g, m, s, t,	e, n, x
S. windhoek	45	g, t	1, 5
S. apapa	45	m, t	—
**S. perinet*	45	m, t	e, n, x, z_{15}
S. klapmuts	45	z	z_{39}
S. jodhpur	45	z_{29}	—
	Grupa X		
**S. billhoven*	47	a	—
S. saka	47	b	—
**S. phoenix*	47	b	1, 5
S. stellingen	47	d	e, n, x
**S. quimbamba*	47	d	z_{39}
S. luke	1, 47	g, m	—
S. bergen	47	i	e, n, z_{15}
S. bootle	47	k	1, 5
S. lyon	47	k	e, n, z_{15}
S. teshie	1, 47	l, z_{13}, z_{28}	e, n, z_{15}
S. moualine	47	y	1, 6
S. mount-pleasant	47	z	1, 5
S. kaolack	47	z	1, 6
**S. chersina*	47	z	z_4
S. bere	47	z_4, z_{23}	z_6
S. quinhon	47	z_{44}	—
	Grupa Y		
S. hisingen	48	a	1, 5, 7
**S. hammonia*	48	e, n, x, z_{15}	z_6
S. dahlem	48	k	e, n, z_{15}
**S. sakaraha*	48	k	z_{39}
S. djakarta	48	z_4, z_{24}	—
**S. ngozi*	48	z_{10}	1, 5

Specii	Antigen somatic	Antigen flagelar	
		Faza 1	Faza 2
Grupa Z			
**S. krugersdorp*	50	e, n, x	1, 7
**S. wassenaar*	50	g, (p), z_{51}	—
**S. greenside*	50	z	e, n, x
**S. bonaire*	50	z_4, z_{32}	—
**S. hooggraven*	50	z_{10}	z_6, z_{42}
Grupa 51			
S. meskin	51	e, h	1, 2
S. overschie	51	l, v	1, 5
S. antsalova	51	z	1, 5
S. treforest	51	z	1, 6
**S. roggeveld*	51	—	1, 7
Grupa 52			
S. flottbek	52	b	—
S. utrecht	52	d	1, 5
S. sainte-marie	52	g, t	—
**S. lobatsi*	52	—	1, 5, 7
Grupa 53			
**S. midhurst*	53	l, z_{28}	z_{39}
**S. humber*	53	z_4, z_{24}	—
Grupa 54			
S. uccle	54	g, s, t	—
Grupa 55			
**S. tranoroa*	55	k	z_{39}
Grupa 56			
**S. artis*	56	b	--
Grupa 57			
**S. locarno*	57	z_{29}	z_{42}
**S. manombo*	57	z_{39}	e, n, x, z_{15}
Grupa 58			
**S. basel*	58	l, z_{13}, z_{28}	1, 5
Grupa 59			
**S. betioky*	59	k	(z)
Grupa 60			
**S. luton*	60	z	e, n, x

* = subgenul II
[ ] = poate lipsi
( ) = nedefinitiv determinat

Schema antigenică a salmonelelor identificate în 1963 (supliment)

Salmonella amba = 11 : k : L (11 : k : 1, z_{13}, z_{28})
Salmonella baguirmi = 30 : y : e, n, x.
Salmonella breukelen = 6, 8 : L : e, n, z_{15} (6, 8 : 1, z_{13} : e, n, z_{15}).
Salmonella casablanca = 45 : k : 1, 7
Salmonella djermaia = 28 : z_{29} : —.
Salmonella dowgi = 50 : y : 1, 6.
Salmonella eilbek = 61 : i : z.
Salmonella farmsen = 13, 23 : z : 1, 6.
Salmonella findorff = 11 : d : z_6.
Salmonella galil Sapiro & Hirsch = 3, 10 : a : e, n, z_{16}.
Salmonella gokul = 1, 51 : d : —.
Salmonella goulfey = 1, 40 : k : 1, 5.
Salmonella halle var. vidin = 28+ : c : 1, 7.
Salmonella hilversum = 30 : k : 1, 2.
Salmonella honelis = 28 : a : e, n, z_{15}.
Salmonella lagos = 1, 4, 12 : i : 1, 5.
Salmonella landala = 41 : z_{10} : 1, 6.
Salmonella lawra = 44 : k : e, n, z_{15}.
Salmonella leiden = 13, 22 : z_{38} : —.
Salmonella ljubljana = 4, 12, 27 : k : e, n, x.
Salmonella malakal = 16 : e, h : 1, 2.
Salmonella menden = 6, 7 : z_{10} : 1, 2.
Salmonella mons var. 27 = 1, 4, 12, 27 : d : 1, w.
Salmonella nienstedten = 6 (7), (14) : b : 1, w.
Salmonella oakland = 6, 7 : z : 1, 6, 7.
Salmonella oevelgoenne = 28 : r : e, n, z_{15}.
Salmonella sankt-georg = 28 : r (i) : e, n, z_{15}.
Salmonella sedgwick = 44 : b : e, n, z_{15}.
Salmonella sladun = 4, 12, 27 : b : e, n, x.
Salmonella sloterdijk = 1, 4, 12, 27 : z_{35} : z_6.
Salmonella synthia = 18 : z_{58} : —.
Salmonella vaertan = 13, 22 : b : e, n, x.
Salmonella vellore = 1, 4, 12, 27 : z_{10} : z_{35}.
Salmonella wilhelmsburg var. = 1, 4, 12 : z_{38} : —.
Salmonella zwickau = 16 : r (i) : e, n, z_{15}.
Salmonella good = 21 : G : e, n, x (21 : f, g : e, n, x).

Redăm în tabelul XXXVIII, schema antigenică de diagnostic al salmonelelor.

Caractere de patogenitate. Patogenitatea salmonelelor este condiţionată de virulenţă şi de activitatea lor toxică.

În ce priveşte virulenţa, reprezentată prin abilitatea germenilor de a traversa peretele intestinal şi a se înmulţi în organism, ea constituie un atribut mai ales al speciilor capabile să determine forme septicemice de boală. În cazul *S. typhi*, virulenţa apare legată de prezenţa comună a antigenului „Vi" şi „O", antigenul „Vi" conferind germenilor şi o rezistenţă sporită la fagocitoză.

Salmonelele incriminate în etiologia toxiinfecţiilor alimentare par, cel puţin pentru om, a avea o virulenţă scăzută.

Toxinele salmonelelor au fost mai bine cunoscute o dată cu lucrările lui Boivin şi L. Mesrobeanu şi, ulterior, ale lui Morgan, care au arătat constituţia chimică şi capacitatea antigenică a acestora. Boivin şi L. Mesrobeanu (1933–1935) au demonstrat că răspunzător pentru toxicitatea germenilor din acest grup este un complex fosfo-lipido-polizaharidic, pus în evidenţă în extractele tricloracetice ale acestor germeni. Complexul toxic reprezintă de fapt antigenul „O" dominant al speciei analizate. El este antigenic, fiind capabil să producă anticorpi specifici care precipită în prezenţa complexului. Antigenul „Vi", care este de aceeaşi natură, este cel puţin de şase ori mai puţin toxic.

Raistrick şi Topley (1934) au obţinut acelaşi complex toxic în fracţiunea alcool-insolubilă a digestiei triptice a germenilor.

Morgan, făcînd extracte din *S. typhi*, forma „S", cu ajutorul dietilenglicolului—solvent cu proprietăţi foarte apropiate nevoilor extractive—a pus în evidenţă un complex polimolecular, mult mai apropiat de realitate, care este constituit dintr-o fosfolipid-polizaharid-proteină, fracţiunea proteică fiind conjugată. Complexul are o activitate toxică de circa 10 DL_{50} pe mg.

Toxinele salmonelelor (endotoxine), inoculate în anumite cantităţi pe cale intraperitoneală la şoarece, produc diaree şi congestie intestinală, urmate de moarte în puţine ore. Ele sînt capabile să cauzeze modificări în conţinutul fosforului anorganic al sîngelui, leucopenie, hipotermie etc. Pe de altă parte, endotoxinele salmonelelor determină tulburări în metabolismul glucozei ca hiperglicemie urmată de hipoglicemie, datorită leziunilor hepatice (necroze şi tromboze), precum şi congestiei sistemului venei porte.

Infecţiile datorite salmonelelor

Germenii din grupul *Salmonella* produc infecţii la om şi animale. Unele specii infectează numai omul, de exemplu : *S. typhi*, *S. paratyphi A.*, *S. sendai*; alte specii infectează numai animalele, de exemplu : *S. abortus equi*, *S. abortus ovis* etc. Aceste specii au fost denumite monopatogene. Majoritatea speciilor de salmonele infectează însă, atît omul, cît şi animalele. Aceste specii au fost denumite pluripatogene.

Salmonelozele omului. La om, infecţiile cu *Salmonella* se manifestă clinic şi patogenic variat. Unele salmoneloze îmbracă aspectul de infecţii septicemice, cunoscute în clinică sub numele de febră tifoidă şi febre paratifoide A, B, C, după speciile de *Salmonella* care le determină.

Cealaltă categorie de infecţii cuprinde toxiinfecţiile alimentare, în care procesul infecţios se petrece aparent numai la nivelul tractului digestiv.

1. *Febra tifoidă* este o infecţie specifică omului cauzată de *S. typhi.*

Aspectul clinic. După o perioadă de incubaţie de 10 – 12 zile, uneori mai mult, boala debutează de obicei insidios, cu tulburări digestive şi nervoase (oboseală, ameţeli, dureri de cap, pierderea poftei de mîncare, diaree sau constipaţie). Se semnalează ulterior epistaxis unic sau repetat, splenomegalie, meteorism, dureri în fosa iliacă, raluri de bronşită şi febră. Disociaţie între febră şi puls.

Febra este de tip continuu, cu tendinţa de creştere în prima săptămînă, de menţinere în platou în săptămîna a doua şi de scădere de obicei în lizis în a 3-a sau a 4-a săptămînă.

Între a 6-a şi a 9-a zi de boală apare o erupţie de pete rozate, lenticulare, pe torace, abdomen şi spate, care persistă circa o săptămînă.

Acest tablou clinic corespunde formei obişnuite de boală. În afară de aceasta însă, se întîlneşte un polimorfism clinic foarte accentuat. Aplicarea tratamentului cu antibiotice (cloramfenicol în special) modifică profund simptomatologia şi formele clinice.

Patogenia febrei tifoide constituie o problemă încă nerezolvată.

Printre numeroasele ipoteze patogenice propuse ar trebui reţinute următoarele :

a) Ipoteza hematogenă, propusă de o serie de autori, printre care şi Sanarelli şi Wright, după care *S. typhi* pătrunde în tubul digestiv, trece prin mucoasa intestinală în ganglionii mezenterici, de unde, prin canalul toracic, pătrunde în curentul sanguin (prima bacteriemie care se întîlneşte la sfîrşitul perioadei de incubaţie). Din sînge, germenii se concentrează mai ales în splină şi ficat, unde proliferează intens, şi de unde trec din nou în circulaţie (a doua bacteriemie care însoţeşte apariţia primelor simptome). O dată a doua bacteriemie instalată, germenii încep să fie eliminaţi pe diferite căi (fecale, urină, glande anexe ale tubului digestiv, eventual focare de supuraţie), sau să determine aşa-zisa stare de microbism latent.

b) Ipoteza lui Reilly, bazată pe reproducerea tabloului anatomic al febrei tifoide la unele specii animale în urma inoculării de germeni vii în ganglionii mezenterici, pretinde că la nivelul ganglionilor limfatici se petrece o liză masivă a *S. typhi*, care pune în libertate endotoxina tifică capabilă să acţioneze asupra sistemului nervos vegetativ.

c) Ipoteza lui Vincent susţine natura toxică a febrei tifoide, *S. typhi* fiind capabilă, după acest autor, de a elabora o toxină cu afinitate neurotropă şi una cu afinitate enterotropă.

d) Unele cercetări experimentale efectuate, urmăresc de asemenea, să clarifice mecanismul patogenic al febrei tifoide. Astfel, Planieles şi Krasinskaia, urmărind soarta germenilor pătrunşi într-un organism, pînă la apariţia primelor simptome, scot în evidenţă evoluţia infecţiei în 3 perioade : în prima perioadă, germenii ar fi distruşi în mare parte la nivelul intestinului, în a doua germenii s-ar înmulţi la nivelul ganglionilor mezenterici, iar în a treia ar trece în sînge, constituind bacteriemia de la sfîrşitul perioadei de incubaţie.

Cercetătorul sovietic Berman, cercetînd deosebirile de reacție dintre un organism imunizat și unul neimunizat față de această boală, a scos în evidență, la animalele imunizate, funcția de barieră a ganglionilor limfatici.

2. *Febrele paratifoidice A* și *B*, produse de salmonelele respective, se diferențiază de febra tifoidă prin benignitate și mortalitate mai scăzută. Febra paratifoidă A se caracterizează prin recăderi multiple, datorite slabei capacități de imunogeneză a *S. paratyphi A*. Febra paratifoidă C, produsă de *S. paratyphi C* și *S. cholerae suis*, se manifestă prin aspecte grave septicemice, cu localizări variate și mortalitate ridicată.

Leziuni anatomopatologice: febrele tifo-paratifoidice fiind boli septicemice, determină leziuni în orice organ sau țesut. Leziunile intestinale domină însă întregul aspect morfo-lezional al acestor boli. Leziunea caracteristică se întîlnește în intestinul subțire și constă în tumefacția, necroza și ulcerațiile plăcilor Peyer și ale foliculilor solitari. Ulcerația tifică ocupă de obicei marginea intestinului opusă inserției mezenterului, ea putînd ajunge seroasa, care uneori se perforează. Eliminarea de escare poate deschide vase importante, cauzînd hemoragii intestinale.

Leziuni importante pot fi întîlnite și în miocard, vase (arterite), splină, rinichi, ficat etc.

3. *Toxiinfecțiile alimentare*. După o incubație de 5—24 de ore, și rar mai mult, tabloul clinic este dominat, în majoritatea cazurilor, de tulburări axate pe tractul digestiv, însoțite de fenomene generale de intensitate variabilă.

Tulburările digestive constau în grețuri, vărsături, sughiț, meteorism, dureri abdominale și scaune diareice. Fenomenele generale constau în dureri de cap, stare generală rea, febră 39—40°, curbatură, amețeală.

Boala evoluează rapid, febra menținîndu-se 2—3 zile în formele medii și 7—10 zile sau mai mult în formele clinice severe. O serie de simptome au la bază deshidratarea organismului și tulburări în balanța electroliților. S-au descris forme clinice variate (Țigankov, Voiculescu, Nestorescu).

Salmonelozele animalelor. Păsările, porcii, bovinele, ovinele, cabalinele și mai ales rozătoarele contractează boala, evoluția acesteia putînd fi acută, subacută, cronică sau sub formă de infecții inaparente. Se întîlnesc foarte des rozătoare excretoare de lungă durată. Salmonelele pot fi izolate, de asemenea, din splină și ganglioni mezenterici de la o serie de animale într-o proporție destul de ridicată (5—40%), care variază în raport cu specia de animale și cu locul capturării lor (cîmp, locuințe, abatoare).

Infecția experimentală. Singurele animale la care s-a putut reproduce febra tifoidă, cu o evoluție însă mult mai scurtă, au fost maimuțele antropoide (Mecinikov, Besredka). Esdall a studiat la *Cynomolgus* raportul dintre infecția tifoidă și reactivitatea imunologică. Acest autor este de părere că virulența *S. typhi* pentru acest animal nu este legată numai de prezența antigenului „Vi", acest ultim antigen determinînd aspecte de patogenitate crescută, mai ales pentru infecția experimentală a șoarecelui.

Inocularea pe cale intraperitoneală la animale de laborator a culturii de *S. typhi* determină septicemii mortale, cu localizări în diferite organe. Gerichter, administrînd în doze convenabile, *per os*, la şoarece, *S. typhi*, *S. paratyphi A.* şi *S. paratyphi B.* a arătat că bacteriile apar în diverse organe (ficat, splină, rinichi) aproximativ la 2 minute după infecţia orală, iar în sînge în 20 de secunde. Nu există diferenţe de durată şi număr între administrarea culturilor de germeni pe cale subcutanată sau pe cale orală.

Celelalte specii de *Salmonella* prezentînd diferenţe de patogenitate în raport cu animalele gazdă, pentru studierea infecţiilor experimentale se pot folosi toate căile de inoculare, inclusiv calea orală.

Imunitate. Foştii bolnavi de febre tifo-paratifoidice prezintă o imunitate durabilă, care de cele mai multe ori persistă toată viaţa. Imunitatea dobîndită prin boală este legată de mecanisme celulare şi plasmatice. Puterea protectoare a serului la foştii bolnavi de febră tifoidă, în opoziţie cu capacitatea de aglutinare şi de fixare a complementului, este prezentă mulţi ani (Ciucă, Nestorescu, Popovici şi colaboratorii).

Un grad de imunitate se poate obţine şi în mod artificial. Administrarea de vaccinuri corpusculare omorîte sau preparate din extracte microbiene s-a dovedit eficientă, mai ales dacă se procedează la revaccinări multiple.

Spre deosebire de febrele tifo-paratifoidice, toxiinfecţiile alimentare cauzate de *Salmonella* par să nu fie întovărăşite de o imunitate durabilă.

Diagnosticul de laborator în infecţiile tifo-paratifoidice

Pentru stabilirea acestui diagnostic se folosesc două categorii de metode. Unele care urmăresc izolarea germenului din produsele patologice, constituind diagnosticul bacteriologic, şi altele destinate să pună în evidenţă prezenţa anticorpilor specifici în ser, constituind diagnosticul serologic.

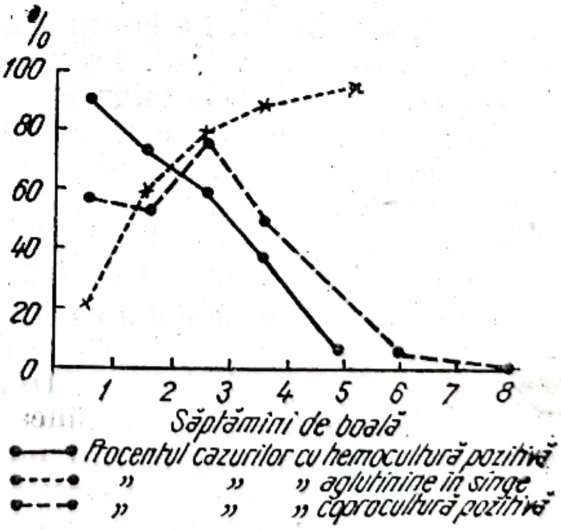


Fig. 102. — Dinamica examenelor pozitive bacteriologice (hemoculturi, coproculturi) şi serologice (aglutinine) în febra tifoidă.

Fără îndoială că diagnosticul bacteriologic constituie diagnosticul de certitudine.

Produsele care se examinează în vederea acestui diagnostic sînt: sîngele, măduva oaselor, materiile fecale, urina, bila, exsudatul petelor lenticulare, iar în cazuri letale, sîngele recoltat din inimă, fragmente de organe (ficat, splină, ganglioni mezenterici, măduva oaselor), conţinutul intestinal, conţinutul vezicului biliare şi urinare.

Alegerea produselor de examinat şi a metodelor de diagnostic se fac în raport cu cazul de studiat, dacă individul este bolnav sau purtător, şi în raport cu perioada de evoluţie a bolii în care se găseşte bolnavul respectiv.

Astfel, în prima săptămînă de boală germenii pot fi găsiți mai ales în sînge și în măduva oaselor, proporția de hemoculturi pozitive depășind în această perioadă 90%. Diferiți cercetători au semnalat prezența germenilor în sînge, încă de la sfîrșitul perioadei de incubație. Tot din prima săptămînă, germenii pot fi găsiți în materiile fecale în circa 60% din cazuri.

În săptămîna a III-a și a IV-a proporția hemoculturilor pozitive scade la 40%, în timp ce aceea a coproculturilor crește la 80% sau mai mult. În săptămîna a II-a germenii pot fi izolați și din urină în circa 30% din cazuri. În perioada de convalescență ca și în starea de purtător produsele de cercetat sînt materiile fecale, bila și urina.

În cursul recăderilor se examinează aceleași produse ca și în primele săptămîni de boală.

Spre deosebire de rezultatele diagnosticului bacteriologic, prezența anticorpilor specifici, aglutinanți, fixatori etc. urmează o curbă inversă, titrul lor fiind jos la începutul bolii, și atingînd maximum la sfîrșitul perioadei de stare și în convalescență.

Condiții de recoltare. Un loc important în ansamblul operațiilor care duc la stabilirea diagnosticului bacteriologic îl constituie modul în care se efectuează recoltarea produselor de cercetat.

În afară de o serie de reguli generale care își găsesc aplicare în cazul tuturor produselor, printre care : recoltarea în condiții aseptice, în vase sterilizate, ermetic închise, evitarea folosirii antisepticelor, etichetarea corectă și însoțirea produsului de o fișă cuprinzînd numele, data recoltării, proveniența produsului, examenul cerut etc., fiecare produs necesită anumite condiții de recoltare.

Recoltarea sîngelui pentru hemocultură. Se efectuează cu toate precauțiile de sterilitate, folosind o seringă de 10—20 ml (preferabil de sticlă), cu acul și pistonul montat, și introdusă într-un tub portseringă, sterilizată, fie la autoclav 30 de minute la 120°, fie prin căldură uscată, o oră, la 180°. La nevoie se poate steriliza seringa și prin fierbere prelungită, 20 de minute.

Recoltarea sîngelui se face prin puncționarea unei vene de la plica cotului, după prealabila aseptizare a tegumentelor prin badijonare cu tinctură de iod și alcool. Imediat după recoltare, sîngele extras în seringă este însămînțat la adăpostul unei flăcări (lampă de spirt, bec de gaz etc.), în flaconul conținînd mediul de cultură.

Recoltarea măduvei oaselor. Aceasta se recoltează de preferință din stern, prin puncție în porțiunea de unire a celor două treimi superioare cu treimea inferioară. După aseptizarea tegumentelor cu tinctură de iod, se anesteziază regiunea cu 10 ml novocaină soluție 1—2%, dintre care 8 ml servesc pentru infiltrația subcutanată și 2 ml pentru infiltrație subperiostală. După circa 10 minute se introduce trocarul, ținînd mînerul în pumn, perpendicular pe stern, pînă la rezistența osoasă. Se fixează cursorul trocarului la 0,5 cm de la suprafața pielii. Prin mișcare de apăsare și rotație se introduce trocarul pînă la cursor. Se scoate mandrenul, se adaptează o seringă sterilă și se aspiră brusc. Senzația dureroasă pe care o acuză bolnavul confirmă poziția medulară a acului. Se scot 3 ml, dintre care 2 ml sînt însămînțați în mediul de cultură, iar restul servește la efectuarea de frotiuri, numărători, medulograme etc. Dacă evacuarea măduvei nu reușește, se introduc cu prudență 1—2 ml ser fiziologic steril.

Recoltarea materiilor fecale. În vederea efectuării unui examen bacteriologic, bolnavul va defeca în vase smălţuite, care au fost opărite cu apă fiartă. Se va evita folosirea sterilizării prin mijloace chimice (soluţii dezinfectante), care ar putea împiedica dezvoltarea germenilor prezenţi în produse.

Se introduc 4—5 g de materii fecale într-un recoltor sterilizat în prealabil prin căldură, şi care este prevăzut cu o linguriţă, cu ajutorul căreia se ridică produsul.

De la bolnav scaunul poate fi recoltat ca atare sau prin clismă, în caz de constipaţie.

Administrarea de purgativ în perioada de stare a bolii este interzisă. Unii clinicieni permit administrarea a 15—20 g sulfat de sodiu în 250 ml apă, în perioada de convalescenţă (10 zile fără febră) şi sub control medical. În operaţiile de depistare a purtătorilor de germeni însă, recoltarea probei trebuie făcută numai după administrarea prealabilă a unui purgativ salin (sulfat de sodiu şi de magneziu în părţi egale, în volum total de 30 g dizolvat în 250 g apă). Este preferabil să nu se folosească pentru examen prima emisiune, în care există un bol format, ci porţiunile lichide, care conţin flora intestinului subţire.

Defecarea se va face tot în vase smălţuite, sterilizate în prealabil prin fierbere, sau chiar pe un carton steril sau hîrtie pergament, de unde proba este introdusă în recoltor care, etichetat corect şi însoţit de fişa respectivă, este trimis la laborator. Examenul materiilor fecale trebuie făcut la interval cît mai scurt de momentul recoltării (maximum în 6 ore). În cazul în care însă însămînţarea nu se poate efectua în acest interval de timp, produsul va trebui recoltat într-un lichid conservant. S-au descris o serie întreagă de lichide conservante, printre care :

1. Soluţia glicerinată sau lichidul *Teague* şi *Clurman*

Glicerină	300 ml
Apă distilată	700 ml
NaCl	5 g

Soluţia se sterilizează la autoclav, la 110°.

2. Soluţia de tetrationat sau lichidul *Şustova*

Soluţie sterilă de hiposulfit de sodiu 5%	100 ml
Soluţie iod-iodurată	2 ml

Această soluţie se prepară astfel :

Iod metalic	20 g
Iodură de potasiu	25 g
Apă distilată	100 ml

Soluţia este preparată în mod steril, în recipiente sterilizate în prealabil.

3. Acid boric 0,5 sau 1 %.
4. Ser fiziologic 8,5—9 ‰.

În cercetări comparative asupra lichidelor de conservare, Zilişteanu şi colaboratorii au observat o capacitate egală de conservare, pentru un interval de 24 de ore, a tuturor acestor lichide conservante.

De asemenea, Balş şi Meitert (1955), cercetînd comparativ conservarea salmonelelor la 37° şi la temperatura camerei pe perioade de timp de 6, 12, 24 şi 48 de ore în următoarele lichide conservante : ser fiziologic 9‰, apă fenolată 0,10%, acid boric 0,5% şi 1%, soluţie glicerinată, ser fiziologic cloroformat (soluţie saturată), precum şi mediul de îmbogăţire Müller-Kauffmann şi D. 29, obţin cele mai bune rezultate cu mediul Müller-Kauffmann şi cu soluţia de acid boric 0,5%, dar numai pentru perioade scurte de timp (12—24 de ore la temperatura camerei).

Oricare ar fi lichidul conservant utilizat, acesta se repartizează în mod steril, cîte 3—5 ml, în recoltoare sterilizate. Ulterior se introduc cam 2 g materii fecale, care se triturează bine în lichidul conservant.

În timpul anotimpului rece se poate renunţa la folosirea lichidelor conservante, dacă însămînţarea produsului se poate face în interval de maximum 24 de ore.

Recoltarea urinii se efectuează în mod aseptic. La femei, recoltarea se face prin sondaj cu sonda fiartă în prealabil. După toaleta vulvei, se introduce cu grijă sonda în uretră. Se aşteaptă emisiunea primelor picături de urină şi apoi se colectează produsul într-un balonaş steril.

La bărbaţi, după toaleta glandului, se recomandă bolnavului să urineze şi se recoltează din jetul de urină într-o eprubetă sau balonaş steril. La bătrîni şi prostatici este bine să se recolteze cu sonda Nélaton (nr.16 sau 17), sterilizată prin fierbere timp de 20 de minute, în apă distilată. Înainte de introducere în meatul urinar, capătul ascuţit al sondei trebuie introdus în ulei de parafină, steril.

Recoltarea bilei se face prin sondaj, cu tub Einhorn, sterilizat în prealabil prin fierbere. Se introduce sonda după prealabila clătire a gurii cu ser fiziologic steril, sau cu apă fiartă şi răcită. Subiectul de examinat este apoi culcat pe partea dreaptă şi prin sondă se aspiră cu seringa sterilă 10—12 ml bilă. Produsul astfel obţinut este apoi însămînţat în medii de cultură.

Recoltarea probelor de organe de la cadavru se face de asemenea respectînd toate măsurile de asepsie. Folosirea de instrumente sterile, foarfece şi pensă pentru fiecare organ în parte, ca şi aseptizarea tegumentelor înainte de deschiderea cadavrului sînt recomandate.

Din fiecare organ se recoltează fragmente care se introduc în cîte o cutie Petri care se transportă la laborator. Din fragmente se prepară frotiuri prin impresiune şi se efectuează însămînţări pe medii de cultură. O altă serie de fragmente sînt introduse în lichide fixatoare, în vederea examenelor anatomopatologice.

Se deschide întîi cavitatea toracică, recoltîndu-se sînge din inimă cu o seringă sterilă sau cu o pipetă cu bulă, după prealabila ardere a suprafeţei pericardului cu o spatulă încălzită la roşu.

În al doilea rînd, se deschide cavitatea abdominală, unde, după ce s-au recoltat fragmente din organe (ficat, rinichi, splină, ganglioni mezenterici), se prelevează prin puncţionare conţinut din vezicula biliară, cavitatea stomacală şi vezica urinară. La sfîrşit, după prealabila legare a capetelor, se ridică fragmente de intestin.

Condiţii de transport. După etichetarea lor corectă, produsele trebuie expediate în cel mai scurt timp la laborator, însoţite de fişa respectivă. În timpul transportului trebuie să se evite udarea dopurilor recipientelor care conţin produsele de cercetat, evitîndu-se astfel contaminarea secundară a acestora şi infectarea personalului care le transportă.

Produsele trebuie transportate în lăzi ermetic închise şi conţinînd gheaţă, condiţie absolut indispensabilă în timpul sezonului cald.

Hemocultura. În cazul în care sîngele a fost recoltat aseptic şi însămînţat imediat după recoltare, este suficient să se folosească bulion simplu conţinînd bilă sterilă de bou în părţi egale. Cantitatea de sînge însămînţat trebuie să se facă în proporţie de 10% faţă de aceea a mediului de cultură, pentru a reduce cît mai mult posibil acţiunea bactericidă a sîngelui. Dacă în prima şi a doua săptămînă de boală este suficient să se însămînţeze 5—10 ml sînge, în perioadele mai tardive de boală, cînd germenii sînt mai rari în circulaţie, se recomandă însămînţarea unor cantităţi mai mari de sînge, 25—30 ml (Gromaşevski).

Hemocultura poate să fie practicată şi prin însămînţarea cheagului obţinut după ridicarea serului, după sfărîmarea lui prealabilă într-un mojar steril sau direct în tub, cu ajutorul unei spatule de metal.

După incubare 24 de ore la 37°, se efectuează o trecere pe geloză oblică din bulionul însămînţat. Atît mediul lichid, cît şi cel solid recent însămînţat sînt incubate la 37°. Culturile obţinute pe geloză sînt apoi identificate, pe baza caracterelor morfologice, biochimice şi serologice. Dacă mediile au rămas sterile, după alt interval de 24 de ore se practică o nouă trecere pe mediu gelozat. Numai în cazul că după un interval de 7 zile mediile au rămas constant sterile, se conchide că hemocultura este negativă.

În eventualitatea că recoltarea sîngelui nu s-a putut efectua cu toate precauţiile de asepsie, se recomandă însămînţarea cheagului pe medii de îmbogăţire cu treceri ulterioare pe medii selective şi diferenţiale, după tehnica similară unei coproculturi.

Medulocultura se practică în condiţii asemănătoare hemoculturii.

Examenul probelor de materii fecale (coprocultura). Probele de materii fecale recoltate fără lichid conservant sînt suspensionate în ser fiziologic dacă scaunul este mulat. După această operaţie se procedează la însămînţări în medii de cultură. Dacă scaunul este diareic, se însămînţează ca atare. În cazul în care recoltarea produsului s-a făcut în lichid conservant, însămînţarea se face din lichidul respectiv în care au fost omogenizate materiile fecale.

Medii de cultură. Dat fiind faptul că în materiile fecale, alături de germenii patogeni din genul *Salmonella*, coexistă o diversitate de specii microbiene saprofite sau condiţionat patogene, aceste specii sînt capabile să se înmulţească mai intens şi mai rapid, reuşind deseori să inhibeze, prin numărul şi metabolismul lor, dezvoltarea florei patogene sau să modifice unele din caracteristicile acesteia ; de aceea se fac eforturi de a găsi medii cît mai adecvate, care să oprească dezvoltarea germenilor de asociaţie, favorizînd, în acelaşi timp, pe a celor patogeni. S-au propus în acest scop, în decursul ultimelor 5 decade, numeroase formule de medii şi, de asemenea, numeroase modificări ale acestor medii, menite să asigure o îmbogăţire, urmată de treceri ulterioare pe medii de izolare, medii selective etc.

Medii de îmbogăţire. Printre mediile curent folosite şi care şi-au făcut dovada eficienţei lor, menţionăm următoarele :

— *Mediul cu bulion tetrationat* (mediul Müller-Kauffmann) a fost recomandat iniţial de către Müller, care folosea un bulion cu tiosulfat de sodiu, carbonat de calciu și soluție iodo-iodurată, la care Kauffmann a adăugat, în 1930, bilă și verde briliant.

Mediul se prepară în modul următor :

Ingrediente :

a) bulion peptonat $pH = 7,4$;

b) carbonat de calciu pulbere, sterilizat prin căldură uscată (180°) ;

c) soluție de tiosulfat de sodiu $(S_2O_3Na_2 + 5H_2O)$ 50 g în 100 ml apă, sterilizată 30 de minute, la 120° ;

d) soluție iodo-iodurată ;

Iod metalic	20 g
Iodură de potasiu	25 g
Apă distilată	100 ml

(se dizolvă iodura de potasiu în apă distilată și apoi iodul metalic) ;

e) bilă sterilă de bou ;

f) soluție verde briliant 1 ‰ în apă distilată.

Prepararea mediului :

Bulion	90 ml
Carbonat de calciu	5 g
Soluție tiosulfat de sodiu	10 ml
Soluție iodo-iodurată	2 ml

La 100 ml din acest amestec se adaugă :

Soluție verde briliant 1 ‰	1 ml
Bilă	5 ml

Deoarece carbonatul de calciu nu se dizolvă, ci se depune la fundul balonului, amestecul trebuie bine agitat în momentul repartizării în tuburi. Mediul astfel preparat este repartizat steril, cîte 7 ml în tuburi sterile.

— *Mediul cu selenit acid de sodiu.* Folosirea selenitului acid de sodiu ca mediu de îmbogățire a fost recomandată de către Leifson, în 1936 (mediul selenit F). Cercetările numeroase întreprinse cu acest mediu în S.U.A. și alte țări au arătat rezultate superioare celor obținute cu mediul Müller-Kauffmann.

Zilișteanu, Combiescu și colaboratorii (1956), cercetînd eficiența mediului cu selenit acid de sodiu, la diverse concentrații, au stabilit concentrația optimă de selenit la 0,4 %.

Formula de preparare este următoarea :

Se prepară două soluții :

Soluția I	Selenit acid de sodiu ($NaHSeO_3$)	2 g
	Apă distilată	100 ml
Soluția II	Lactoză	2 g
	Peptonă	2,5 g
	Fosfat disodic	2,5 g
	Fosfat monosodic	2,5 g
	Apă distilată	400 ml

Fosfații mono- și disodici trebuie adăugați pînă la obținerea unui pH neutru.

Soluțiile sînt sterilizate separat, 30 de minute la 100° (în autoclav deschis).

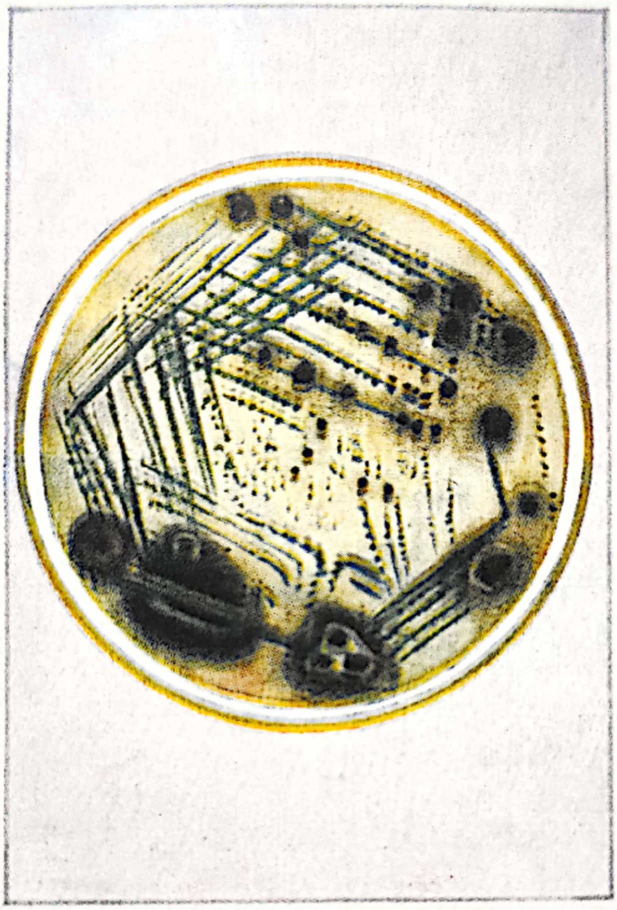


Fig. 103. — Cultură de *S. typhi* pe mediul Wilson-Blair (colonii negre cu luciu metalic și colonii mici, verzi).

Soluţia I are aspect limpede, incolor.

Soluţia II prezintă un precipitat care se lasă să se depună 24 de ore la temperatura camerei. Se decantează supernatantul clar.

Se amestecă soluţia I cu soluţia II. Se controlează pH, care trebuie să fie 7.

Medii selective. Mediile de îmbogăţire, avînd defectul de a nu fi prea selective, permit dezvoltarea germenilor saprofiţi (de pildă, genurile *Escherichia* şi *Proteus*), în grade variate. Pentru acest motiv, pentru izolarea salmonelelor s-au propus aşa-numitele medii selective, medii solide, de constituţie complexă, conţinînd substanţe antiseptice colorate sau necolorate, diferite zaharuri şi alte substanţe, menite să asigure selectivitatea mediului şi favorizînd, în acelaşi timp, dezvoltarea salmonelelor. Printre acestea, cel mai eficient s-a dovedit a fi mediul complex, recomandat de către Wilson şi Blair.

Mediul Wilson-Blair (preparat după indicaţiile lui Schmidt, modificat de Balş).

Ingrediente :

1. Amestec de bază :

a) Se dizolvă 3 g bismut amoniu-citrat în 25 ml apă distilată sterilă, rece. După dizolvarea bismutului, se adaugă picătură cu picătură, agitînd mereu, 1 ml hidrat de sodiu 10%. Dacă dizolvarea nu se produce, sarea pierzînd o parte din amoniac, se adaugă 1—2 picături dintr-o soluţie de amoniac comercial concentrat; dacă nu se dizolvă nici după adăugarea amoniacului, substanţa nu poate fi utilizată ;

b) Se dizolvă 10 g de sulfit de sodiu (Na sulphurosum pro analysi, anhidru, Na_2SO_3) în 35 ml apă distilată, sterilizată, rece, iar dacă substanţa este cristalizată ($Na_2SO_3 + 7H_2O$), cantitatea utilizată va fi dublă, deci 20 g.

Sulfitul de sodiu putîndu-se degrada cu uşurinţă, se va cerceta din punct de vedere al conţinutului în substanţă activă, cunoscînd că nu poate fi utilizat dacă nu conţine cel puţin 60% substanţă pură.

Metoda dozării sulfitului de sodiu :

Reactivi :

— soluţie N/10 de hiposulfit de sodiu (tiosulfat de sodiu);

— soluţie N/10 de iod (titrată şi potrivită după soluţia de hiposulfit de sodiu). Se va conserva în sticlă bine închisă şi ţinută la întuneric. Soluţia trebuie retitrată înainte de utilizare;

— soluţie amidon 0,5—1%.

Metoda de titrare : se pipetează într-un păhărel Berzelius exact 10 ml soluţie de iod N/10, se adaugă încetul cu încetul 10 ml din soluţia de sulfit de sodiu de cercetat (0,63 g sulfit de sodiu la 100 ml apă distilată). Se aşteaptă 1—2 minute. Se adaugă dintr-o biuretă hiposulfit de sodiu (tiosulfat de sodiu) N/10, pînă cînd soluţia de iod se decolorează la galben pai. Se adaugă apoi 5—10 picături de soluţie de amidon, pînă la obţinerea culorii albastre, şi se continuă adăugarea de tiosulfat pînă la decolorarea amidonului.

Calcul : cantitatea de tiosulfat rămas în biuretă reprezintă procentul de sulfit de sodiu pur din proba de cercetat.

Cantitatea de tiosulfat consumată este egală cu procentul substanţelor străine; de exemplu : dacă s-au picurat 2,5 ml tiosulfat de sodiu, aceasta reprezintă 75% sulfit de sodiu + 25% substanțe străine, în proba de sulfit de sodiu cercetată.

c) Se dizolvă 12,6 g fosfat acid de sodiu cristalizat ($Na_2HPO_4 + 12H_2O$) în 15 ml apă distilată sterilizată, încălzită la 15—60°.

d) Se dizolvă 10 g glucoză în 25 ml apă distilată, sterilizată, rece. Soluția este încălzită pînă la fierbere, menținîndu-se la această temperatură timp de 1 minut (control cu ceasornicul).

Se amestecă soluțiile în ordinea următoare: a + b + c + d, obținîndu-se amestecul de bază, care se agită și se păstrează la întuneric, la temperatura camerei. Amestecul de bază se utilizează atît timp cît își păstrează aspectul alb lăptos.

2. Soluție de sulfat feros 8% în apă distilată, sterilizată, rece. Soluția capătă un depozit. Nu se agită și se folosește din lichidul clar, supernatant.

3. Soluție verde briliant (Holborne sau Holiday) 0,5% în apă distilată, sterilizată, rece. Această soluție se utilizează maximum 2 luni de la preparare.

Prepararea mediului:

Agar 2%, pH 7,2, topit și răcit la 55° (control cu termometru al apei în care se topește agarul)	100 ml
Sulfat feros 8%	1 ml
Verde briliant 0,5%	1 ml
Amestec de bază, agitat imediat înainte de folosire	20 ml

Se agită și se toarnă în plăci Petri.

Mediul trebuie preparat în momentul întrebuințării. Cu cît intervalul dintre prepararea mediului și însămînțarea lui este mai lung, cu atît salmonelele cresc mai greu sau de loc. Ori de cîte ori se prepară mediul, se va rezerva o placă martor, care se va însămînța cu o picătură dintr-o cultură în bulion de 24—48 de ore de *S. typhi*.

Mediul Leifson este folosit ca mediu selectiv atunci cînd îmbogățirea s-a făcut pe mediul cu selenit (vezi formula mediului la diagnosticul de laborator al germenilor din grupul *Shigella*).

Mediul cu bilă uscată (*Istrati-Meitert*). Este recomandat mai ales pentru repicarea coloniilor lactoză-negative, dezvoltate pe mediul Leifson (vezi formula mediului la diagnosticul de laborator al germenilor din grupul *Shigella*).

Medii diferențiale. Principiul care stă la baza preparării acestor medii constă în diferențele de capacitate fermentativă asupra unei serii de zaharuri, a diferitelor grupe de germeni din familia *Enterobacteriaceae*. În genere, ele conțin încorporate în geloză zahărul respectiv, împreună cu un indicator colorat.

Zahărul cel mai des folosit în prepararea mediilor diferențiale este lactoza, comportarea față de acest hidrocarbonat permițînd diferențierea germenilor din genul *Escherichia* (lactozo-pozitiv) de majoritatea celorlalte *Enterobacteriaceae*, care nu fermentează lactoza.

Dintre mediile diferențiale, cele mai folosite sînt:

1) *mediul Drigalski*, care conține încorporat în geloza obișnuită 2%, o proporție de 15‰ lactoză și tinctură de turnesol, ca indicator;

2) *geloza lactozată cu albastru de bromtimol*, conţinînd încorporate în geloză 2%, lactoză 15‰ şi 0,4% din soluţia apoasă de albastru de bromtimol 20—25‰.

Asupra valorii comparative a mediilor de îmbogăţire şi selective arătate mai sus s-au făcut numeroase cercetări. Kleiner, comparînd în 1931 valoarea mediului original Müller cu cel completat de către Kauffmann a stabilit superioritatea celui din urmă, obţinînd cu acesta 68% rezultate pozitive, faţă de 50% cît a obţinut cu primul.

Kauffmann raporta, în 1935, în urma examinării unui număr de 10 182 de probe de materii fecale, folosind mediul de îmbogăţire cu bulion tetrationat, o creştere de circa 500% a proporţiei de *Salmonella*, izolate din toxiinfecţii alimentare (*S. typhimurium*, *S. enteritidis*).

Zilişteanu, Combiescu şi colaboratorii (1956), cercetînd comparativ valoarea mediilor de îmbogăţire cu selenit de sodiu 0,2 — 0,4%, Müller-Kauffmann şi acid boric 1%, paralel cu însămînţarea directă a materiilor fecale pe mediul selectiv Wilson-Blair, obţin, dintr-un total de 90 de probe pozitive, 91% rezultate pozitive prin îmbogăţire în mediul cu selenit 0,4%, 87,7% în mediul cu selenit, 0,2%, 86,6% prin însămînţare directă pe mediul Wilson-Blair, 74,4% prin îmbogăţire în mediul Müller-Kauffmann şi 57,7% prin îmbogăţire în mediu cu acid boric 1%.

Tehnica coproculturii. Se însămînţează într-unul din mediile de îmbogăţire semnalate mai sus (preferabil pe două) cîte 0,5—1 ml din proba ca atare, suspensionată în lichidul conservant sau în ser fiziologic. Concomitent cu însămînţarea în medii de îmbogăţire se recomandă şi însămînţarea directă pe mediul Wilson-Blair.

După incubare la 37°, timp de 5—24—48 de ore, a mediului de îmbogăţire însămînţat (timpul optim de incubaţie fiind 10—12 ore pentru mediul Müller-Kauffmann şi 18—24 de ore pentru mediul cu selenit, se fac treceri pe medii selective: din mediul cu selenit pe mediul Leifson, iar din mediul Müller-Kauffmann pe mediul Wilson-Blair.

Trecerea din mediul de îmbogăţire pe mediul Wilson-Blair, ca şi însămînţarea directă din suspensia de materii fecale se fac depunîndu-se pe suprafaţa plăcii cu mediu o picătură luată cu o ansă, cu un diametru de 6—7 mm, sau 2 picături alăturate una de alta, dacă folosim o ansă cu o buclă obişnuită. Picătura este întinsă apoi în striuri apropiate cu ajutorul unei pipete Pasteur, îndoite la vîrf. Însămînţarea se face mai întîi pe o treime din placa Wilson-Blair şi, ulterior, continuînd cu striurile pe restul plăcii, avînd grijă ca o zonă de aproximativ o jumătate de centimetru, situată la marginea plăcii Petri, să nu fie însămînţată, deoarece coloniile de *Salmonella* au tendinţa de a creşte la periferia mediului.

După incubare timp de 48 de ore la 37°, se examinează plăcile.

Coloniile aparţinînd germenilor din genul *Salmonella* apar, fie sub formă de colonii negre, cu diametrul de 1—2 mm, turtite, aderente la mediu, cu luciu şi halou metalic, fie sub formă de colonii mici, de culoare verde-albăstrui.

Spre deosebire de aceste aspecte ale coloniilor de *Salmonella*, coloniile de *Escherichia* apar de culoare maro-negricioasă, mai mari, groase, luxuriante, mucoase, uşor detaşabile de mediu, fără luciu şi halou metalic, iar coloniile germenilor din grupul *Proteus* apar de culoare cafenie sau verde murdar, cu totul necaracteristice.

Cu tot aspectul net deosebit, coloniile suspecte trebuie trecute de pe mediul Wilson-Blair, pentru confirmare, pe un mediu diferențial (mediul Drigalski sau geloză lactozată, cu albastru de bromtimol).

În cazul folosirii mediului Leifson ca mediu selectiv, salmonelele dezvoltă colonii roz transparente, deosebite de coloniile de *Esch. coli* care sînt de culoare roșie și de cele de *Proteus* care sînt mate, uneori cu centrul mai întunecat (H_2S pozitiv). Coloniile lactozo-negative de pe mediul Leifson sînt trecute ulterior pe mediul cu bilă uscată Istrati-Meitert sau pe geloză lactozată cu albastru de bromtimol conținînd 0,1% hiposulfit de sodiu (ambele medii împiedicînd invazia germenilor din grupul *Proteus* care ar fi putut să fie repicate printre coloniile lactozo-negative). Repicările se fac folosind metoda sectoarelor.

Culturile sînt studiate ulterior din punct de vedere al caracterelor morfologice și biochimice, precum și al identificării lor serologice.

Studiul caracterelor morfologice. Cercetarea mobilității se face pe preparate proaspete, între lamă și lamelă, folosind culturi tinere de 8—10 ore în bulion.

Pentru a stimula dezvoltarea aparatului ciliar la tulpini care la izolarea din organism prezintă o mobilitate redusă, se recomandă treceri repetate, fie în bulion cu subcultivare din 8 în 8 ore, fie prin tuburi în *U* cu geloză 0,5%.

Se face, de asemenea, examenul culturii pe frotiuri, colorate prin metoda Gram.

Studiul caracterelor biochimice va fi efectuat în două etape, în raport cu obiectivul urmărit. În prima etapă se vor cerceta acele caractere biochimice care permit încadrarea tulpinii de cercetat în genul *Salmonella*. În a doua etapă, după ce tulpina a fost identificată serologic ca aparținînd unui anumit tip de *Salmonella*, se vor stabili caracteristicile biochimice ale tipului respectiv, precum și eventualele variante biochimice în interiorul aceluiași tip.

În raport cu caracteristicile generale ale germenilor din genul *Salmonella*, se vor cerceta următoarele *reacții de metabolism*:

— fermentarea unor zaharuri, printre care: lactoza, zaharoza, salicina, adonita, glucoza, manita, dulcita și maltoza;
— cercetarea producerii de indol; −
— producerea de hidrogen sulfurat (H_2S); +
— cultivarea în medii cu citrat; +
— reacția la roșu de metil; +
— reacția Voges-Proskauer;
— cercetarea capacității de a produce sau nu urează; =
— comportarea față de KCN; −
— cercetarea amino-acid-decarboxilazelor. +

(Tehnicile reacțiilor sînt redate în capitolul *Enterobacteriaceae-generalități*).

A doua serie de cercetări asupra caracteristicilor biochimice va fi efectuată după identificarea serologică și va cuprinde, așa cum am mai arătat, studiul acelor caractere care permit diferențieri în interiorul grupului *Salmonella* și al variantelor în interiorul tipurilor serologice. În acord cu schema biochimică de diagnostic al tipurilor de *Salmonella*, întocmită de Kauffmann, se vor cerceta :

— reacțiile fermentative asupra celor 6 zaharuri : arabinoză, dulcită, inozită, ramnoză, trehaloză și xiloză ;
— lichefierea gelatinei ;
— fermentarea acizilor organici ;
— fermentarea glicerolului (reacția Stern).

Tehnica reacției :

Se prepară următorul mediu de bază :

Extract de carne	10	g
Peptonă	20	g
ClNa	5	g
Apă de robinet	1000	ml

pH = 7-7,2. Sterilizare la 100°, timp de 3 zile, cîte una oră.

Separat se prepară următoarele :

1) soluție alcoolică de fucsină bazică 10% ;

2) soluție apoasă sulfit de sodiu 10%, în apă distilată sterilă (preparare extemporanee) ;

3) glicerină neutră sterilizată la 105° timp de o jumătate de oră.

La 100 ml mediu de bază se adaugă : 0,2 ml soluție fucsină ; 2 ml soluție de sulfit de sodiu ; 1 g glicerină.

Se repartizează în tuburi de hemoliză 1-2 ml. Se însămînțează numai cu ansa, din tulpina de cercetat cultivată pe mediu solid. Incubare la 37°, timp de 8 zile, cu citire zilnică.

Apariția unei culori violet-rubinie în 1-3 zile indică o reacție intens pozitivă ; iar apariția la 7 zile, o reacție slabă (+). Reacția se însoțește de trei martori : mediul neînsămînțat, martor sigur pozitiv și martor sigur negativ.

Identificarea serologică. Cunoașterea structurii antigenice a tulpinilor de cercetat și identificarea lor conform schemei antigenice de diagnostic, elaborată de către Kauffmann-White și în permanență completată de Kauffmann pe măsură ce alte tipuri noi sînt descrise, rămîn singurele metode care permit identificarea tipurilor serologice de *Salmonella*.

Identificarea serologică se efectuează prin reacții de aglutinare față de seruri aglutinante antisomatice și antiflagelare, preparate pe iepuri, cu ajutorul antigenelor specifice.

Pentru prepararea serurilor imune anti-,,O'', se imunizează iepuri prin 4-5 inoculări intravenos, cu culturi încălzite $2^{1}/_{2}$ ore la 100°, obținîndu-se astfel antigenul somatic ,,O'', debarasat de antigenul flagelar.

Pentru prepararea serurilor anti-,,H'' se folosesc culturi tinere în bulion, în vîrstă de 8 ore, tratate cu formol 0,2%.

Pentru prepararea serului ,,Vi'' este preferabil să se folosească o tulpină *Ballerup*, bogată în antigen ,,Vi''. Se inoculează suspensia microbiană vie.

Serurile monoreceptoare se obțin prin adsorbție.

Pentru identificarea tipurilor de *Salmonella* sînt necesare cel puțin următoarele seruri aglutinante :

I. ser polivalent ,,O'' anti-*Salmonella*, conținînd fracțiunile antigenice ,,O'' 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15 și 27 ;

II. seruri de grup ,,O'' : 1, 2, 12 (ser ,,O'' anti-*S. paratyphi A.*) aO
4, 5, 12 (ser ,,O'' anti-*S. paratyphi B.*) βO
6, 7 (ser ,,O'' anti-*S. paratyphi C.*) cO
9, 12 (ser ,,O'' anti-*S. typhi* + *enteritidis*) ; TO

III. ser. anti-,,Vi'' ;

IV. seruri anti-,,H'' de fază specifică :
(,,a'') (ser ,,H'' anti-*S. paratyphi A*)
(,,b'') (ser ,,H'' anti-*S. paratyphi B*)
(,,c'') (ser ,,H'' anti-*S. paratyphi C*)
(,,d'') (ser ,,H'' anti-*S. typhi*)
(,,g, m'') (ser ,,H'' anti-*S. enteritidis*)
(,,i'') (ser ,,H'' anti-*S. typhimurium*)
(,,r'') (ser ,,H'' anti-*S. heidelberg*) ;

V. ser ,,H'' de fază nespecifică ... 1, 2, 3, 5.

Tehnica de identificare a tipurilor serologice de Salmonella. Pentru o primă orientare se cercetează aglutinabilitatea tulpinii de examinat față de serul polivalent ,,O'', care cuprinde anticorpii corespunzători principalelor fracțiuni antigenice ,,O'', prezente la germenii aparținînd genului *Salmonella*. Se utilizează pentru această cercetare testul de aglutinare pe lamă, care se practică cu serul diluat la titrul recomandat și cu cultură pe mediul solid (geloză simplă sau un mediu diferențial, și nu direct de pe mediul Wilson-Blair, mediu care modifică aglutinogenele germenilor). Aglutinarea vizibilă arată că tulpina este o salmonelă ; aglutinarea absentă nu exclude existența unei specii de *Salmonella*, putînd fi vorba de specii al căror antigen ,,O'' este mascat de antigenul ,,Vi'', situat la suprafața corpului microbian.

O dată stabilit că tulpina aparține genului *Salmonella*, se continuă identificarea căutînd să se vadă cărei grupe de antigen ,,O'' din schema de diagnostic aparține. Pentru aceasta, se cercetează tulpina față de serul ,,O'' al diferitelor grupe, prin aglutinări pe lamă.

Situat într-o anumită grupă, se procedează la identificarea speciei prin aglutinări cu seruri monovalente ,,H'' de fază specifică, și seruri ,,H'' de fază nespecifică, corespunzînd speciilor care aparțin grupului ,,O'', din care face parte tulpina de identificat. Rezultatele obținute prin aceste aglutinări permit interpretarea și identificarea tulpinii, după caracterele ei antigenice, folosind schema de diagnostic Kauffmann-White.

În cazul în care o tulpină nu aglutinează cu serul polivalent ,,O'', ea trebuie cercetată față de serul anti-,,Vi'', pentru decelarea antigenului ,,Vi'', care este capabil să prilejuiască inaglutinabilitatea antigenului ,,O'' al tulpinilor care îl posedă pe cel dintîi. În caz de aglutinare negativă, se poate afirma că tulpina cercetată nu aparține vreuneia din speciile cu fracțiuni antigenice ,,O'' corespunzătoare serului polivalent ,,O''. Ca test de siguranță a aglutinării pe lamă se practică aglutinarea tulpinii în tub față de serurile care au dat aglutinare pozitivă pe lamă, pînă la epuizarea titrurilor acestor seruri.

În cazul tulpinilor cu fracțiuni antigenice comune mai multor specii, identificarea este, uneori, mult îngreuiată și poate preta la erori ; în aceste cazuri se recurge, de asemenea, la aglutinarea în tub, folosind ca antigen, pentru decelarea fracțiunilor ,,H'', culturi în bulion, formolate 0,2%, iar pentru decelarea fracțiunilor ,,O'', culturi pe geloză înclinată, suspensionate în ser fiziologic și încălzite 1 oră la 100°.

Tehnica de identificare mai sus arătată poate fi folosită de către laboratoarele care posedă seria arătată mai sus de seruri aglutinante, identificarea celorlalte specii prevăzute în schema de diagnostic rămînînd sarcina Centrului național de salmonele, care posedă o serie mai completă de seruri aglutinante.

Rezumînd indicațiile tehnice de mai sus, se poate folosi schema următoare de lucru:

1. situarea tulpinii izolate în genul *Salmonella*, prin aglutinări cu ser polivalent „O";
2. cercetarea antigenului „Vi" prin aglutinări cu ser anti-„Vi", inaglutinabilitatea sau aglutinabilitatea slabă a unor tulpini prin ser polivalent „O" putîndu-se datori prezenței acestui antigen;
3. situarea tulpinii recunoscute ca *Salmonella* într-unul din grupurile „O" ale schemei de diagnostic, prin aglutinări cu serurile de grup „O";
4. cercetarea fracțiunilor „H", de fază specifică și nespecifică, prin aglutinări cu serurile anti „H" și interpretarea rezultatelor după schema Kauffmann-White.

Se va utiliza testul de aglutinare pe lamă la diluțiile recomandate pe fiola de ser, folosind o cultură de 24 de ore pe geloză 2%, iar ca test de siguranță se vor face aglutinări în tub, cu serurile respective anti-„O", „H" și „Vi", diluate pînă la titrul serului. Citirea reacțiilor de aglutinare de tip „H", în tub, se face după incubare de 2 ore la 52° și 15 minute la temperatura camerei. Pentru aglutinările de tip „O", citirea se face după 24 de ore de incubare la 52°. Pentru aglutinările „H" trebuie evitată prelungirea incubării peste 2 ore, o durată mai mare producînd și aglutinări somatice. Pentru aglutinarea „Vi" incubarea de 2 ore la 37° și 22 de ore la temperatura camerei este metoda de ales.

În cazul izolării din organism a unor culturi de fază nespecifică „H", fapt care nu permite identificarea tipului, se recomandă cultivarea tulpinii de cercetat pe plăci cu agar semisolid 5‰, conținînd cîteva picături de ser imun „H" de fază nespecifică, după metoda recomandată de Gard. Germenii în fază nespecifică vor fi împiedicați să se dezvolte, selecționîndu-se numai cei în faza specifică. Testînd prin aglutinări pe lamă coloniile dezvoltate pe acest mediu, față de seruri „H" de fază specifică, se va putea determina tipul serologic, în acord cu schema antigenică de diagnostic.

Examenul bilei. Se efectuează după tehnica expusă anterior pentru materiile fecale.

Examenul probelor de urină (*urocultură*). Urina recoltată aseptic, în condițiile descrise anterior, este însămînțată într-un mediu de îmbogățire sau chiar direct pe un mediu selectiv, fie ca atare, fie sedimentul obținut după centrifugare. În continuare, tehnica de izolare și identificare a salmonelelor cuprinde aceiași timpi și folosește aceleași metode ca și cele descrise pentru coprocultură.

Examenul probelor de organe recoltate de la cadavru. Fragmentele de organe sînt triturate în mojar cu ser fiziologic și, eventual, cu nisip de cuarț. Fragmentele de ansă intestinală recoltate sînt tăiate cu o foarfecă sterilă, prelevînd cu pipeta Pasteur conținut intestinal, care se suspensionează în ser fiziologic. Suspensiile astfel obținute sînt însămînțate în medii de îmbogățire, urmînd tehnica obișnuită de izolare și identificare.

Diagnosticul serologic. Serodiagnosticul Widal clasic, folosind ca antigen culturi vii de *S. typhi*, *S. paratyphi A* şi *S. paratyphi B*, care erau puse în contact cu diluţii din serul de examinat, este o reacţie cantitativă, care în momentul cînd a fost descrisă a constituit un real progres în stabilirea diagnosticului de laborator al febrelor tifo-paratifoidice.

Pe măsură însă ce cunoştinţele asupra structurii antigenice a salmonelelor au progresat, iar acţiunile de vaccinare antitifo-paratifoidică s-au extins, această reacţie serologică a devenit insuficientă, putînd chiar produce erori în interpretare. Folosind ca antigene culturi microbiene totale, cu tot complexul lor antigenic, reacţia Widal pune în evidenţă, pe de o parte, anticorpii ,,H'' care, după cum se ştie, sînt puternic stimulaţi de vaccinarea specifică, după care persistă timp îndelungat şi nu au un rol important în diagnosticul şi prognosticul bolii, iar pe de altă parte, nu prezintă nici o indicaţie în formele de boală produse de variante aciliate, cînd reacţia Widal este negativă.

De aceea reacţia Widal clasică a fost înlocuită cu analiza calitativă serică, în care se folosesc în reacţie suspensii antigenice ,,O'' şi ,,H'' separate, şi care permite decelarea în mod calitativ a aglutininelor ,,O'' şi ,,H''. Pentru efectuarea acestei reacţii se folosesc suspensii alcoolate şi formolate, deosebite pentru *S. typhi*, *S. paratyphi A* şi *S. paratyphi B*.

Tehnica reacţiei. Se prepară cu serul bolnavului diluţii 1/10 şi 1/100 în ser fiziologic 9 ‰.

Se folosesc 6 serii a 7 tuburi de aglutinare, fiecare serie urmînd să primească un alt antigen.

Schema reacţiei

Tuburi :		1	2	3	4	5	6	7
Ser fiziologic (ml)		—	0,2	0,3	—	0,2	0,3	0,4
Ser de cercetat (ml)	dil 1/10	0,4	0,2	0,1	—	—	—	—
	dil. 1/100	—	—	—	0,4	0,2	0,1	—
Antigen (ml)		0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Diluţia finală obţinută		1/25	1/50	1/100	1/250	1/500	1/1000	martor

Incubare la 52° sau 37°

Citirea reacţiei se face pentru seriile de diluţii care au primit antigene formolate, după 2 ore la 52° sau 37° şi 10 minute la temperatura camerei, iar pentru cele care au primit antigene alcoolate, după 20 de ore la 52° şi 10–15 minute la temperatura camerei.

Pentru cercetarea aglutininelor ,,Vi'' în serul bolnavilor şi purtătorilor se folosesc diluţii joase de ser (1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 etc.), care sînt puse în contact cu antigen ,,Vi'' formolat. Lucrînd cu diluţii joase, o atenţie deosebită trebuie dată calităţii serurilor de cercetat; ele trebuie să fie limpezi, sterile şi nehemolizate; serurile infectate sau hemolizate produc de obicei reacţii nespecifice.

Tehnica reacţiei de aglutinare ,,Vi''. Se repartizează în tuburi de aglutinare cîte 0,5 ml diluţii din serul de examinat, la care se adaugă un volum egal (0,5 ml) antigen ,,Vi'' formolat, diluat la densitatea de 500–600 milioane de germeni/ml. Sînt necesari o serie de martori, şi anume: doi martori pentru suspensia ,,Vi'', unul pentru aspectul ,,S'' (0,5 ml antigen+

0,5 ml ser fiziologic), care trebuie să fie negativ, şi unul pentru calităţile aglutinante ale antigenului (0,5 ml antigen + 0,5 ml ser „Vi" la diluţia limită), care trebuie să fie pozitiv; un martor, serul de cercetat (1 ml ser diluat 1/10), care trebuie să nu prezinte aglutinate.

Citirea reacţiei se face după o incubare de 2 ore la 37°, şi 20 de ore la temperatura camerei.

Interpretarea analizei calitative serice. Apariţia aglutininelor „H" şi „O" în serul bolnavilor are loc încă din prima săptămînă de boală, dar la un titru nesemnificativ.

Titrul acestor aglutinine creşte ulterior, ajungînd un maximum între a 16-a şi a 29-a zi de boală. Titruri ridicate continuă să se menţină vreme îndelungată în convalescenţă, ca şi după vindecarea clinică. În genere, aglutininele „H" ating titruri mai ridicate (1/2 500—1/5 000) decît al celor „O" (1/250—1/1000).

Valoare diagnostică şi prognostică au aglutininele „O".

Interpretarea rezultatelor se face astfel:

a) Oamenii normali pot avea, de obicei, în serul lor aglutinine „H" şi „O" pînă la titrul de 1/160 pentru *S. typhi*, pînă la titrul de 1/40 pentru *S. paratyphi A*, 1/80 pentru *S. paratyphi B* şi 1/10 pentru antigenul „Vi" (mai ales cînd provin din regiuni endemice de febră tifoidă).

b) Aceste titruri cresc la cei vaccinaţi pe cale subcutanată; pentru aglutinine „H", titruri de 1/500—1/1 000 sînt curent întîlnite, persistînd între 7 şi 12 luni de la vaccinare; pentru aglutininele „O" titrurile sînt de 1/200—1/300, mai rar 1/500, scăzînd sau chiar dispărînd în primele 2—3 luni de la vaccinare. Apariţia aglutininelor anti- „Vi" se face de obicei tîrziu şi se constată numai la 25—35% din vaccinaţi, titrurile variind între 1/10 şi 1/20 (Combiescu, Nestorescu, Popovici).

c) Dacă se ţine seamă de aceste date, se poate conchide:

Cînd boala survine în primele 3 luni de la vaccinare, diagnosticul nu poate fi făcut decît prin punerea în evidenţă a germenului cauzal (diagnostic bacteriologic); după această dată, diagnosticul de laborator poate fi făcut şi prin examenul serologic, dacă se utilizează numai datele referitoare la apariţia şi evoluţia titrului aglutininelor anti- „O". Un bolnav suspect febril, vaccinat cu vaccin TAB cu 3 luni înainte, care prezintă în serul lui un titru aglutinant anti- „O", superior titrului 1/200, este suspect de febră tifoidă sau respectiv de febră paratifoidică A sau B şi, dacă la un examen repetat la 5—7 zile titrul aglutinant anti- „O" este în creştere, acesta poate fi considerat bolnav, respectiv de febră tifoidă sau de febră paratifoidică. Apariţia tardivă în serul bolnavilor a aglutininelor „Vi" prezintă importanţă minoră pentru un diagnostic serologic precoce.

În concluzie, în interpretarea diagnosticului serologic calitativ trebuie să se ţină seamă de evoluţia anticorpilor în dinamică, precum şi de antecedentele bolnavului (vaccinarea TAB, provenienţa dintr-o regiune endemică etc).

Diagnosticul de laborator al toxiinfecţiilor alimentare

Deoarece aceste sindroame au o evoluţie de scurtă durată, iar apariţia anticorpilor specifici este tardivă, redusă sau chiar absentă, baza diagnosticului o constituie diagnosticul bacteriologic.

Produsele în care trebuie cercetată prezența agentului patogen sînt următoarele:

1. probe din produse patologice (vărsături, materii fecale, urină, sînge) recoltate de la bolnavi;

2. probe din alimentele incriminate sau din apă;

3. probe de produse (materii fecale, urină) recoltate de la suspecți, contacți, foști bolnavi, personalul mînuitor de alimente;

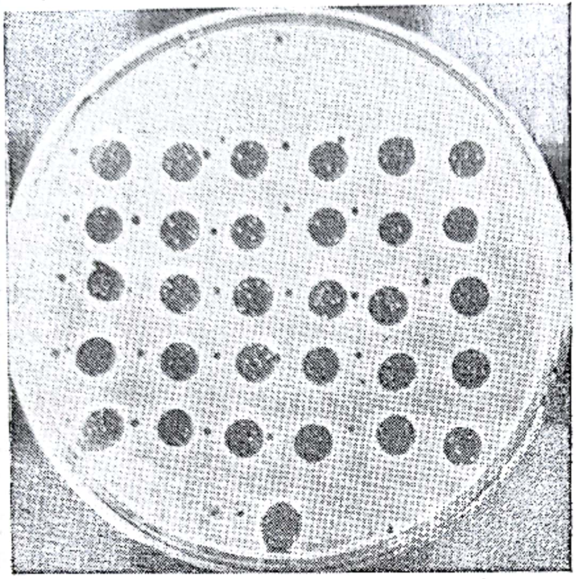


Fig. 104. — Lizotipia *S. typhi* — lizotip A.

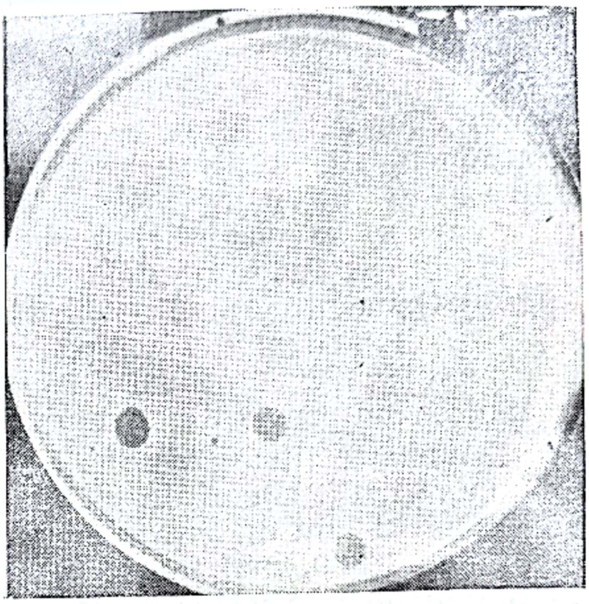


Fig. 105. — Lizotipia *S. typhi* — lizotip 38.

4. probe de organe recoltate de la cazurile decedate.

Tehnica examenului bacteriologic al acestor produse este similară cu cea expusă anterior.

Epidemiologie

Cunoștințele pe care le posedăm astăzi în privința procesului epidemic al salmonelozelor sînt numeroase; ele privesc sursa de infecție, căile de transmitere și starea de receptivitate a populației.

Sursa de infecție. *În febra tifoidă și febrele paratifoidice* sursa de infecție este legată de omul bolnav și purtătorul de germeni. Dacă omul bolnav este izolat în staționar, potențialitatea epidemiologică întreținută de acesta este scăzută și controlabilă; nu tot același lucru se întîmplă cu purtătorii de germeni, care fiind deseori greu de depistat și supravegheat, întrețin fondul endemic al unei regiuni determinînd izbucniri epidemice de intensitate variabilă.

În febra tifoidă și febrele paratifoidice pivotul întregii anchete epidemiologice este constituit din stabilirea originii infecției și a filiației cazurilor care pot fi stabilite cu ajutorul lizotipiei.

O → FC → L

Metoda lizotipiei a fost preconizată de către Craigie și Yen, care au constatat că un bacteriofag „Vi" — denumit fagul „Vi" II — posedă, pe lîngă calitatea de a liza *S. typhi* cu antigen „Vi", și o putere remarcabilă de adaptare. Antrenat de mai multe ori pe o tulpină de S. *typhi*, acest bacteriofag capătă repede o putere litică specifică pentru această tulpină, ca şi pentru toate tulpinile înrudite cu ea. Întregul grup al tulpinilor care reacţionează în acelaşi fel, faţă de un acelaşi bacteriofag adaptat, constituie un acelaşi lizotip.

În acest fel s-au putut diferenţia o serie de lizotipuri „Vi", diferenţierea prin bacteriofagi constituind un mijloc ştiinţific modern de investigaţie epidemiologică. Numărul de lizotipuri de *S. typhi* recunoscute azi este de 77.

Pentru determinarea apartenenţei fagice a unei tulpini de *S. typhi* se foloseşte schema de lizotipie, fiecare tip bacteriofagic avînd un anumit spectru de lizosensibilitate.

Redăm în tabelul XLI schema de lizotipie a *S. typhi* (1958), la care s-au adăugat în 1962, în urma hotărîrii Comitetului internaţional pentru fagi enterici, următoarele lizotipuri : D_9, D_{10}, D_{11}, E_{10}, F_3, F_4, F_5, J_2, J_3, K_2, M_2, M_3, 43, 44, 45, 46, C_{10}, J_4, K_3, 47 şi 48.

Lizotipurile de *S. typhi* cele mai răspîndite în ţara noastră sînt : A, E_1, 38, F_1, D_1 etc. (Ciucă, Nestorescu, Ţupa, 1960).

Foloasele aduse de practicarea lizotipiei *S. typhi* au trezit interesul pentru cercetări, în vederea aplicării metodei şi la alte specii de *Salmonella*.

Astfel, încă din 1943, Felix şi Callow, şi ulterior Scholtens, au reuşit să obţină o serie de preparaţii fagice anti- *S. paratyphi B.* Schema lui Felix şi Callow cuprinde astăzi 10 tipuri şi subtipuri, denumite 1, 2, 3a, $3a_1$, 3b, Jersey, Beccles, Taunton, B.A.O.R. şi Dundee.

Stabilitatea lizotipurilor este tot atît de strictă ca şi la *S. typhi*.

Prezentăm în tabelul XLI schema de lizotipie a *S. paratyphi B.* propusă de Felix şi Callow (Anderson şi Williams, 1956) :

Tabelul XLI

Tulpini tip	Tipuri fagice									
	1	2	3a	$3a_1$	3b	Jersey	Becc.	Taut.	B.A. O.R.	Dund.
1	CL	CL	++	++	—	CL	—	—	—	<SCL
2	—	CL	—	—	—	—	—	—	—	SCL
3a	—	—	<CL	<CL	OL	—	<CL	<CL	OL	<CL
$3a_1$	—	—	<CL	<CL	—	—	—	—	—	CL
3b	—	—	—	—	OL	—	<CL	<CL	OL	<CL
3 Jersey	—	—	—	—	—	<CL	<CL	<CL	<CL	<CL
Beccles	—	—	—	—	—	—	<CL	<CL	—	<CL
1 Taunton	—	—	—	—	—	—	—	<CL	—	<CL
B.A.O.R.	—	—	—	—	—	—	—	—	OL	—
2 Dundee	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<CL

Lizotipurile de *S. paratyphi B*, cele mai răspîndite în ţara noastră sînt, în ordinea frecvenţei : Taunton, Dundee şi Jersey.

În *toxiinfecţiile alimentare*, principalul rezervor de infecţie îl constituie în primul rînd animalele şi numai în al doilea rînd omul.

(1 Păsările constituie rezervorul cel mai important de infecţie, atît prin răspîndirea mare a salmonelelor pe care le pot găzdui, cît şi prin multiplele mecanisme de transmitere a infecţiei la om (carne, ouă). Porcii constituie un rezervor de infecţie tot atît de important. Rozătoarele (şobolanii şi şoarecii) suferă în mod natural de salmoneloze, ceea ce face ca ele să constituie un rezervor tot aşa de important. Şi alte animale pot fi rezervoare de germeni: bovidee, cîini, pisici, vulpi, artropode etc.

Printre salmonelele care determină cel mai frecvent toxiinfecții alimentare, se situează pe primul plan *S. typhimurium*. În scopul stabilirii originii izbucnirilor de toxiinfecții alimentare cu *S. typhimurium*, Felix și Callow, Lilleengen, Boyd etc. au pus la îndemînă preparații fagice și scheme de lizotipie pentru această specie de *Salmonella*.

Redăm în tabelul XLII schema de lizotipie a *S. typhimurium*, folosind un set de 13 preparații fagice, propusă de Felix și Callow (Anderson, 1961):

Tabelul XLII

Schema de lizotipie a S. typhimurium

Tulpini test	Preparațiuni fagice												
	1	1a	1a var 1	1 b	2	2 a	2 b	2 c	2 d	3	3 a	4	5
4 1	OL	OL	OL	<CL	CL	CL	<CL	CL	OL	OL	OL	±	OL
1 1a	—	OL	OL	<CL	CL	<CL	OL	<CL	OL	OL	OL	—	OL
6 1a var 1*	—	OL	<CL	<CL	—	±	OL	—	OL	OL	<CL	—	++
3 1b	—	—	<CL	<CL	CL	CL	OL	<CL	OL	<CL	<CL	—	—
5 2	—	—	—	—	CL	CL	—	CL	—	—	—	—	—
7 2a	—	—	—	—	—	CL	<CL	CL	<CL	—	—	—	—
2 2b	—	—	—	—	—	—	OL	—	OL	—	—	—	—
2c	—	—	—	—	<CL	<CL	<CL	<CL	<CL	—	—	—	—
2d	—	—	—	—	±	±	±	±	<CL	—	—	—	—
3	—	—	±	+++	—	—	—	—	—	OL	++	—	—
3a	—	—	±	—	—	—	+++	—	SCL	+	<CL	—	—
4	—	—	—	—	—	±	—	±	±	—	—	<CL	—
5	—	—	—	++	—	—	—	—	—	++	—	—	OL

* Tipul 1a var. 1 a fost desemnat inițial ca tipul 3b.

Lizotipurile de *S. typhimurium* puse în evidență în țara noastră sînt, în ordinea frecvenței: 1a, 2b, 1b, 1, 2, 1a var. 1 și 2a (Nestorescu, Popovici și colaboratorii, 1959 și 1961).

Căile de transmitere. Principalele căi de transmitere în salmoneloze sînt apa, laptele și diferite alimente, poarta de intrare a germenilor fiind calea digestivă. Pentru studiul căilor de transmitere se procedează la izolarea și identificarea agenților patogeni după tehnica descrisă la capitolul „Diagnostic de laborator".

Cum izolarea salmonelelor din apă este adesea dificilă, s-au recomandat și metode indirecte de studiu, care urmăresc punerea în evidență a bacteriofagilor enterici ca indicatori ai prezenței germenilor respectivi.

Aceste ultime metode au căpătat o valoare reală numai după descoperirea bacteriofagilor specifici formelor „Vi" de *S. typhi*, ceilalți bacteriofagi enterici izolați din ape prezentînd un marcat grad de polivalență care nu îngăduie concluzii valabile.

În transmiterea toxiinfecțiilor alimentare, alimentele frecvent incriminate sînt carnea și preparatele de carne, ouăle și preparatele de ouă, laptele și produsele lactate. Vegetalele și fructele sînt mai rar incriminate. Alimentele se contaminează prin două mecanisme :

— animalul care a furnizat alimentul a fost bolnav ;

— alimentul provenit de la un animal sănătos a fost contaminat ulterior în cursul preparării sale culinare de către purtătorii umani, de către dejecțiile rozătoarelor infectate, prin muște, gîndaci și alte insecte, prin excrementele animalelor domestice (cîini, pisici), prin apa infectată folosită în cursul procesului tehnologic de preparare etc.

Ca factori favorizanți ai izbucnirii și transmiterii salmonelozelor trebuie considerate : anotimpurile, aglomerațiile, tulburările digestive și condițiile rele de igienă individuală și colectivă (felul de viață).

Starea de receptivitate a populației poate fi modificată cu ajutorul vaccinărilor specifice.

Pentru febra tifoidă și febrele paratifoidice A și B se folosesc vaccinuri cunoscute sub numele de vaccinuri TAB. Ele pot fi preparate din suspensii microbiene omorîte sau din extracte microbiene.

Vaccinarea oferă o imunitate dobîndită care, în general, cînd este completă și la timp efectuată, pune deseori organismele receptive la adăpost de o infecție spontană.

Imunitatea obținută prin vaccinare este limitată ; persoane vaccinate în condiții optime pot contracta boala, dacă infecția este masivă, sau se găsesc în condiții fiziologice precare. În aceste cazuri, boala evoluează cel mai adesea benign și cu o durată redusă.

Profilaxia toxiinfecțiilor alimentare cu Salmonele nu beneficiază de vaccinare specifică.

Genul (grupul) Arizona

Definiție. Sînt incluse în acest grup o serie de microorganisme care prin caracterele lor ocupă o poziție intermediară între grupele *Escherichia* și *Salmonella*. Prima tulpină din acest grup a fost izolată de la reptile de către Caldewell și Ryerson (1939).

Pe baza asemănărilor de structură antigenică cu salmonelele, Kauffmann (1941) a denumit-o *Salmonella Arizona*.

Ulterior s-au izolat și alte tulpini, de la păsări, mamifere și om. Constatîndu-se însă diferențe biochimice și serologice între aceste tulpini și cele din genul *Salmonella*, ele au fost cuprinse într-un grup independent, denumit genul *Arizona*.

Habitat. Germenii din acest grup au fost izolați de la omul sănătos, din scaunele bolnavilor de enterită, precum și din scaunele unor bolnavi de toxiinfecții alimentare.

Așa după cum s-a arătat, au fost izolați și de la reptile în aparență normale sau bolnave, de la păsări (fazani, curcani), ca și de la diferite animale domestice.

Caractere morfologice. Bacilii, cu dimensiunile de 2—4 μ/0,6—0,7 μ, nesporulați, necapsulați ; sînt ciliați, mobilitatea la izolarea lor din organism este uneori redusă.

Caractere de cultură : sînt similare salmonelelor.

Caractere biochimice și de metabolism : aerobi și facultativ anaerobi, cresc între 10 și 44°, avînd temperatura optimă de dezvoltare la 37° : limite de pH 4,4—7,8, pH optim 6—7.

Fermentează, cu producere de gaz, glucoza, manita, maltoza, arabinoza, ramnoza, trehaloza, xiloza și sorbitolul. Nu fermentează zaharoza, salicina, dulcitolul, inozitolul, adonitolul. Unele tulpini pot fermenta lactoza (24 de ore — 30 de zile). Produc H_2S abundent, nu formează indol și nu hidrolizează ureea. Dau reacția roșului de metil pozitivă și reacția Voges-Proskauer negativă. Reduc nitrații în nitriți, utilizează citratul ca unică sursă de carbon și lichefiază lent gelatina.

Germenii din grupul *Arizona* nu elaborează fenilalanindezaminază, prezintă testul malonatului de sodiu pozitiv (test important de diferențiere) și elaborează lizin- și ornitindecarboxilază și uneori arginindihidrolază.

Redăm în tabelul XLIII caracteristicile biochimice ale tulpinilor de *Arizona*, studiate de către Edwards (Kauffmann, 1954).

Tabelul XLIII

	Monofazic					Difazic				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Adonitol	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Dulcitol	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+2	+	+
Arabinoză	+	+2	+	+	+	+	+	+	+	+
Xiloză	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ramnoză	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+
Maltoză	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicină	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+9
Inozitol	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Lactoză	−	+8	−	+1	+12	X	+1,2	+2	+1,2	+ 2
Zaharoză	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Manitol	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Glucoză	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Indol	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
H_2S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatină	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amoniu glucoză	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amoniu citrat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KNO_3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Roșu de metil	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Uree	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
d-tartrat	−14	−14	+ 8	−14	−14	−14	−14	−14	−14	+ 8
l-tartrat	−14	−14	−14	−14	−14	−14	−14	−14	−14	−14
Sodiu-citrat	+ 2	X	+ 2	+ 2	+ 2	+ 2	+ 2	+ 2	+ 2	−14
Mucat	+ 2	+ 2	−14	+ 2	+ 2	−14	+ 2	+ 2	−14	+ 2

Structura antigenică : s-au pus în evidență o serie de antigene somatice și flagelare, dintre care unele sînt înrudite cu antigenele de *Salmonella*. Edwards, West și Bruner au întocmit o schemă antigenică de diagnostic, pe care o redăm în tabelul XLIV.

Tabelul XLIV

Grup „O”	Subgrup „O”	Antigen „O”	Antigen „H”	
			Faza 1	Faza a 2-a
1	1,2	1,2	1, 2, 5	
		1,2	1, 3, 11	
	1,3	1,3	1, 2, 5	
		1,3	1, 2, 6	
		1,3	1, 2, 10	
		1,3	1,6,7,9	
		1,3	1, 3, 11	
	1,4	1,4	1, 2, 5	
		1,4	1, 3, 11	
		1,4	13, 14	
		1,4	31	33
5		5	1, 2, 5	
		5	1, 2, 10	
		5	1, 3, 11	
		5	13, 14	
		5	16,17,18	
		5	17, 20	
10		10	1, 2, 5	
		10	1, 2, 6	
		10	1, 2, 10	
		10	1, 3, 11	
		10	13, 14	
		10	17, 20	
		10	33	30
11		11	1, 2, 5	
		11	13, 14	
		11	16, 17, 18	
12		12	1, 2, 5	
		12	1, 6, 7	
		12	1, 6, 7,9	
		12	1, 7, 8	
		12	21	23
13		13	1, 2, 5	
		13	1, 3, 11	
		13	1, 7, 8	
		13	13, 14	
		13	13, 15	
		13	16, 17,18	
		13	17, 20	
14		14	1, 2, 5	
		14	1, 6, 7	
24		24	24	28
		24	26	25
25		25	27	28
26		26	23	30
		26	29	30
6		6	1, 2, 5	
		6	13, 14	
7		7	1, 2, 6	
		7	1, 7, 8	
8		8	1, 7, 8	
		8	13, 14	
		8	17, 20	
9		9	1, 2, 5	
		9	1, 2, 6	
		9	1, 3, 11	
		9	1, 7, 8	
		9	13, 14	
		9	13, 15	
		9	16, 17, 18	
15		15	1, 2, 6	
		15	1, 3, 11	
		15	13, 14	
		15	27	28
16		16	13, 14	
		16	21	22
		16	23	25
17		17	1, 2, 5	
		17	13, 15	
		17	29	25
18		18	13, 14	
19		19	1, 2, 5	
		19	1, 2, 6	
		19	21	22
20		20	1, 2, 6	
21		21	1, 2, 5	
		21	1, 2, 6	
		21	1, 2, 10	
		21	1, 3, 11	
		21	17,20	
22		22	16, 17, 18	
23		23	23	25
		23	24	25
27		27	31	22
28		28	32	28
29		29	31	33

În prezent numărul antigenelor ,,O'' este de 33, iar al celor ,,H'' de 42. Au fost identificate pînă astăzi 249 de serotipuri (1963). S-au constatat strînse legături serologice între germenii din grupurile *Salmonella* şi *Arizona*.

Caractere de patogenitate. La om au fost izolate tulpini din grupul *Arizona* din enterite la copii şi adulţi, toxiinfecţii alimentare, colecistite şi chiar meningite.

Diagnostic de laborator. Recoltarea produselor patologice, transportul şi examinarea lor se fac după tehnici identice cu cele descrise pentru *Salmonella*.

Genul (grupul) Citrobacter

Definiţie. În acest grup au fost introduse, după sugestia mai veche a lui Werkman şi Gillen, tulpini asemănătoare *Esch. coli*, care însă au capacitatea de a folosi citratul ca unică sursă de carbon.

Grupul *Citrobacter* cuprinde astăzi tulpinile microbiene de *Esch. freundii* şi *Bethesda-Ballerup*, care în clasificaţii anterioare erau incluse în grupul *Escherichia*.

Esch. freundii

Istoric. Descrisă în 1928 de către Braak. Denumirea de *freundii* s-a dat în cinstea lui A. Freund, care a descris la aceste tulpini în 1881, trimetilenglicolul ca produs de fermentare.

Habitat. Se găseşte normal în intestinul omului şi animalelor. Pare a fi foarte răspîndit în natură.

Caractere morfologice: bacili scurţi, cu extremităţi rotunjite, pot apărea izolaţi, în perechi sau lanţuri scurte. Sînt mobili, fiind semnalate însă şi variante imobile.

Caractere de cultură: se dezvoltă pe medii obişnuite. Însămînţat în bulion, tulbură uniform mediul. Pe geloză dezvoltă colonii netede, strălucitoare, cenuşii, uneori cu aspect gras. Pe gelatină dezvoltă colonii asemănătoare celor de pe geloză. Pe mediul cu cartof, *Esch. freundii* creşte abundent, coloniile avînd un aspect gălbui.

Caractere biochimice şi de metabolism: aerob şi anaerob facultativ, creşte bine între 30 şi 37°.

Fermentează cu producere de gaz: glucoza, manita, lactoza, arabinoza, xiloza, maltoza, ramnoza, trehaloza, glicerolul şi sorbita. Fermentează în mod variabil dulcita, zaharoza, salicina şi nu are acţiune asupra dextrinei, adonitolului şi inozitei. Cu unele excepţii nu produce indol, reduce nitraţii în nitriţi, produce H_2S. Nu lichefiază gelatina, foloseşte citratul de sodiu ca unică sursă de carbon şi nu descompune sau descompune lent ureea.

Reacţia roşului de metil este pozitivă, reacţia Voges-Proskauer negativă (cu foarte rare excepţii). Testul Braun este pozitiv. Produce trimetilenglicol prin fermentaţia anaerobă a glicerolului.

Structura antigenică a *Esch. freundii* nu este încă bine studiată. Se cunosc mai multe tipuri serologice, unele din fracţiunile antigenice ale *Esch. freundii* fiind comune cu antigenele prezente la tulpini *Bethesda-Ballerup*. Pînă în prezent nu există o schemă antigenică de diagnostic.

Bethesda-Ballerup

Istoric. Prima tulpină de *Ballerup* a fost descrisă de către Kauffmann şi Moller (1940), sub denumirea de *Salmonella Ballerup*, deoarece această tulpină prezenta caractere biochimice asemănătoare salmonelelor, iar din punct de vedere serologic poseda antigen ,,Vi'', identic cu al *S. typhi* şi al *S. paratyphi C*.

Studii ulterioare au arătat că alte tulpini de *Ballerup* prezentau caractere deosebite de acelea ale *S. Ballerup*, ceea ce a dus la constituirea unui grup separat denumit grupul *Ballerup*.

Pe de altă parte, în 1948 Edwards, West şi Bruner au sugerat includerea într-un grup pe care l-au denumit *Bethesda* a unor tulpini asemănătoare biochimic cu cele din grupul *Ballerup* şi care fuseseră studiate anterior sub diferite denumiri, de către diferiţi cercetători.

Ulterior, cele două grupe au fost contopite într-un grup unic *Bethesda-Ballerup* şi apoi, dat fiind faptul că tulpinile din acest grup fermentează lactoza şi utilizează citratul ca unică sursă de carbon, au fost incluse împreună cu *Esch. freundii* în grupul *Citrobacter*.

Habitat. Tulpinile *Bethesda-Ballerup* se găsesc în conţinutul intestinal al omului şi animalelor.

Caractere morfologice şi de cultură : asemănătoare cu cele de la *Salmonella*.

Caractere biochimice şi de metabolism : aerobi şi anaerobi facultativ.

Fermentează glucoza cu producere de gaz, sorbita, arabinoza, xiloza, ramnoza, maltoza, manita ; fermentează variabil (unele tipuri) dulcita, salicina, inozita şi zaharoza. Tulpinile Bethesda-Ballerup se caracterizează prin fermentarea tardivă a lactozei. Formează H_2S, nu produc de obicei indol şi nu lichefiază gelatina. Nu descompun ureea, folosesc citratul ca unică sursă de carbon, dau reacţia roşului de metil pozitivă, reacţia Voges-Proskauer negativă şi testul Braun pozitiv.

Nu produc fenilalanindezaminază, nu cultivă în prezenţa malonatului de sodiu, în genere nu produc lizindecarboxilază şi produc uneori arginindihidrolază şi ornitindecarboxilază.

Structura antigenică. Fiind germeni mobili, posedă antigene flagelare ,,H'' legate de cili şi antigene somatice ,,O'' legate de corpul bacterian.

Pe baza identificării diferitelor fracţiuni antigenice ,,O'' şi ,,H'', Edwards a propus o schemă antigenică de diagnostic, care este redată în tabelul XLV (Kauffmann, 1954).

Caractere de patogenitate. Germenii *Bethesda-Ballerup* pot, în anumite condiţii, să devină patogeni şi să determine în special infecţii intestinale, singuri sau în asociaţie cu alţi germeni.

Nestorescu, Popovici şi Szegli (1964) au descris tulpini atipice de *Bethesda-Ballerup* capabile să elaboreze o exotoxină de natură proteică, foarte activă.

Diagnosticul de laborator comportă aceeaşi conduită ca şi diagnosticul salmonelelor.

Tabelul XLV

Grup „O"	Antigen „O"	Antigen „H"
1	1a, 1b, 1c	1,2
	1a, 1b, 1c	14, 15, 16
	1a, 1b, 1c	(21), 25, 26
	1a, 1b, 1c	(25), 21, 27
	1a, 1b, 1c	39
	1a, 1b, 1c	(9) . . .
2	2a, 1b	1,2
	2a, 1b	5,6
	2a, 1b	7, (8), 10
	2a, 1b	8, 10, 11
	2a, 1b	14, 15, 16
	2a, 1b	(13), 17
	2a, 1b	21, 22
	2a, 1b	(23), 28
	2a, 1b	32, 34
	2a, 1b	35, 37
	2a, 1b	39
3	3a, 3b, 1c	4,5
	3a, 3b, 1c	5,6
	3a, 3b, 1c	7, (8), 10
	3a, 3b, 1c	8
	3a, 3b, 1c	8, 9
	3a, 3b, 1c	(9), 13, 14
	3a, 3b, 1c	14, 15, 16
	3a, 3b, 1c	(13), 17
	3a, 3b, 1c	21, 22
	3a, 3b, 1c	21, 23
	3a, 3b, 1c	21, 24
	3a, 3b, 1c	(21), 25, 27
	3a, 3b, 1c	(9), 29, 30
	3a, 3b, 1c	(9), 29, 31
	3a, 3b, 1c	32, 33
	3a, 3b, 1c	32, 34
	3a, 3b, 1c	39
	3a, 3b, 1c	47
	3a, 3b, 1c	(4), (33) . . .
	3a, 3b, 1c	—
4	4a, 4b	4, 5
	4a, 4b	5, 6
	4a, 4b	7, (8), 10
	4a, 4b	(9), 13, 14
	4a, 4b	(13), 17
	4a, 4b	(13), 18, 19
	4a, 4b	19, 20
	4a, 4b	(9), 29, 30
	4a, 4b	(9), 29, 31
	4a, 4b	32, 34
	4a, 4b	44, 45
	4a, 4b	44, 46
	4a, 4b	(31), (45) . . .
5	5a, 5b, 4b	53, 54
	5a, 5b, 4b	63
	5a, 5b, 4b	73
	5a, 5b, 4b	—
6	6, 4b, 5b	72
	6, 4b, 5b	(54) . . .
7	7, 3b, 1c	4, 5
	7, 3b, 1c	7, (8), 10
	7, 3b, 1c	8, 9
	7, 3b, 1c	(9), 13, 14
	7, 3b, 1c	(13), 17
	7, 3b, 1c	21, 22
	7, 3b, 1c	21, 23
	7, 3b, 1c	(21), 25, 27
	7, 3b, 1c	39
	7, 3b, 1c	68
	7, 3b, 1c	(4), (33) . . .
8	8a, 1c	1, 2
	8a, 1c	5, 6
	8a, 1c	(9), 13, 14
	8a, 1c	(9), 13, 15
	8a, 1c	21, 22
	8a, 1c	(21), 25, 27
	8a, 1c	(9), 29, 30
	8a, 1c	32, 33
	8a, 1c	39
	8a, 1c	53, 55
	8a, 1c	67
	8a, 8b	1, 2
	8a, 8b	8, 12
	8a, 8b	(9), 13, 14
	8a, 8b	(21), 25, 26
	8a, 8b	(21), 25, 27
	8a, 8b	35, 37
	8a, 8c	5, 6
	8a, 8c	(9), 13, 14
	8a, 8c	(13), 17
	8a, 8c	(21), 25, 27
	8a, 8c	32, 33
	8a, 8c	35, 37
9	9a, 9b	1, 2
	9a, 9b	2, 3
	9a, 9b	4, 5
	9a, 9b	8, 9
	9a, 9b	(13), 17
	9a, 9b	(21), 25, 26
	9a, 9b	32, 33
	9a, 9b	32, 34
	9a, 9b	39
	9a, 9b	48
	9a, 9b	—
10	10, 9b	(13), 17
	10, 9b	(9), 29, 30
	10, 9b	—

Tabelul XLV (continuare)

Grup „O”	Antigen „O”	Antigen „H”
11	11	(9), 13, 14
	11	14, 15, 16
	11	32, 33
	11	35, 37
	11	35, (36), 38
	11	77, 78
	11	83
12	12a, 12b	5, 6
	12a, 12b	(13), 17
	12a, 12b	35, 36
	12a, 12b	57
	12a, 12c	57
	12a, 12c	62
13	13	5, 6
	13	59
	13	65
	13	66
	13	69
14	14	40, 41
	14	61
15	15	(13), 18, 19
	15	21, 22
	15	32, 34
16	16	21, 24
	16	58
17	17	21, 24
	17	44, 45
	17	75
18	18	56
19	19	14, 15, 16
	19	87
20	20	40, 41, 43
21	21a, 21b	60
22	22	64
23	23	52
24	24	49, 51
25	25	35, (36), 38
26	26	49, 50
	26	59
27	27	40, 41
28	28, 1c	70
29	29	8, 10, 11
	29	40, 42
	*29	73
	*29	74
	*29	74, 75
	*29	75
	29	77, 78
	*29	77, 79
	*29	77
	29	77, 80
	29	77, 81
	29	77, 88
	*29	82
	*29	83
	29	84
	29	85
	*29	86
	29	87
	29	—
30	30, 21b	76
31	31	71
32	32	(23), 28

*Legendă:** — serotipuri cu antigen „Vi”.

Genul (Grupul) Klebsiella

Definiţie. Sînt cuprinşi în acest grup o serie de germeni, apărînd sub formă de bacili scurţi, cu capete rotunjite, imobili, nesporulaţi, care de obicei posedă capsulă. Pe medii solide produc culturi mucoase. Germenii aparţinînd acestui grup cuprind numeroase specii patogene pentru om şi animale. Printre speciile patogene pentru om trebuie semnalate:

a) *Klebsiella pneumoniae* (*B. friedländerii*), izolat adesea din infecţiile tractului respirator, precum şi din infecţii urinare;

b) *Klebsiella ozaenae*, izolat de la pacienţi suferind de ozenă şi

c) *Klebsiella rhinoscleromatis*, incriminat în etiologia rinoscleromului.

Istoric. În 1882, Von Frisch a izolat prima klebsielă, sub numele de *B. capsulatus*, de la bolnavi suferinzi de rinosclerom. Un an mai tîrziu, Friedländer a izolat un germen asemănător din plămînul unor bolnavi morţi de pneumonie, germen denumit mai tîrziu pneumobacilul Friedländer. În 1893, Abel a descris bacilul ozenei.

Henriksen a cuprins toate aceste organisme în grupul *Klebsiella*.

Habitat. Pot fi găsiţi la omul sănătos, în tractul respirator, în intestin, în urină, precum şi pe suprafaţa tegumentelor.

În anumite condiţii pot determina infecţii ale aparatului respirator, urinar, precum şi infecţii generalizate.

Caractere morfologice. Bacili scurţi, 1—2μ lungime şi 0,8μ grosime, cu capete rotunjite, grupaţi cîte doi sau trei, în sensul lungimii lor. În produse patologice apar sub formă de cocobacili, înconjuraţi de o capsulă bine evidenţiată. În culturi vechi, pe medii fără lichide organice, pot apărea variante necapsulate. Sînt imobili, nesporulaţi, Gram-negativi prezentînd adesea o coloraţie bipolară.

Caractere de cultură. În bulion, klebsielele tulbură mediul în 24 de ore la 37°, formînd un văl vîscos, care cade ulterior la fundul tubului, întregul mediu căpătînd un aspect gelatinos. Pe geloză dezvoltă colonii alb-cenuşii, luxuriante, adesea confluente, cu aspect mucos, care curg la suprafaţa mediului.

Pe cartof dezvoltă culturi mucoase, cenuşii-gălbui, care mai tîrziu iau culoarea cafelei cu lapte.

Pe gelatină produc colonii alb-cenuşii, netede, opace, uşor ombilicate.

Se observă deseori apariţia de variante cu aspecte de cultură diferite.

Caractere biochimice şi de metabolism. Sînt aerobe şi anaerobe facultativ. Limitele de creştere sînt între 12 şi 43°, cu temperatură optimă de dezvoltare la 37°. Fermentează, cu producere de gaz, glucoza, inozita, glicerolul, celobioza, amidonul insolubil şi — fără gaz — lactoza, zaharoza şi manita. Fermentează variabil dulcita şi nu fermentează inulina.

Deseori aciditatea produsă în cursul proceselor de fermentare este tranzitorie, mediile redevenind alcaline (fenomen de cameleonaj).

Coagulează laptele, nu produc indol, nu lichefiază gelatina, serul coagulat şi albuşul de ou. Reduc nitraţii în nitriţi şi nu produc H_2S. Reacţia Voges-Proskauer este pozitivă, reacţia roşului de metil este negativă. Descompun ureea şi folosesc citratul ca unică sursă de carbon. Cresc în mediile cu KCN şi malonat de sodiu şi elaborează lizindecarboxilază.

Rezistenţa la agenţi fizici, chimici şi biologici. Căldura umedă le omoară la 55° în 30 de minute. La temperatura camerei şi la întuneric pot supravieţui săptămîni şi luni de zile.

Sînt sensibile la acţiunea antisepticelor în concentraţii obişnuite, sensibile faţă de aureomicină, teramicină şi polimixină B; mai puţin sensibile faţă de streptomicină şi cloramfenicol, sînt insensibile la acţiunea penicilinei şi sulfamidelor.

Structura antigenică. În grupul *Klebsiella* sînt descrise trei feluri de antigene: un antigen somatic „O” întîlnit la formele „S”, un antigen somatic „R” întîlnit la formele „R” şi un antigen capsular „K”.

Antigenele „O" şi „K" sînt de natură polizaharidică, pe cînd antigenul „R" este de natură proteică.

La noi în ţară, Barber şi colaboratorii, izolînd materialul capsular, necontaminat de poliozidul somatic, au constatat că cel dintîi conţine 11% azot şi 22% glucide. Folosind cromatografia pe hîrtie, au pus în evidenţă prezenţa glucozei, galactozei, fucozei, şi xilozei şi a acizilor glucuronici şi galacturonici.

Antigenul „O" este un antigen termostabil care rezistă 2 1/2 ore la 100°.

Formele capsulate, din cauza prezenţei antigenului „K", sînt „O" inaglutinabile, antigenul „O" conferă specificitate de grup.

Prin lucrările lui Kauffmann şi Ørskov, tulpinile de *Klebsiella* au fost împărţite pe baza antigenului „O" în 5 grupe. Antigenul „K" este de asemenea termostabil, arătînd un grad de rezistenţă mai mic decît antigenul „O". Antigenul capsular „K" conferă tulpinilor care-l posedă specificitate de tip. S-au descris pînă în prezent 72 de fracţiuni antigenice „K".

Pe baza antigenelor „O" şi „K", Kauffmann şi Ørskov au stabilit o schemă antigenică de diagnostic.

Redăm în tabelul XLVI schema antigenică de diagnostic a grupului *Klebsiella* (Kauffmann, 1954).

Tabelul XLVI

Grupul „O"	Tipul capsular
1	1, 2, 3, 7, 8, 10, 12, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 29, 30, 32, 34, 37, 39, 41, 44, 45, 46, 47, 62
2	2, 3, 4, 5, 6, 8, 27, 28, 35, 43, 59
3	11, 25, 31, 33, 48, 49, 50, 51, 53, 54, 55, 58
4	15, 42
5	57, 61
„R" sau nedeterminat	9, 13, 14, 17, 18, 36, 38, 40, 52, 56, 60

Caractere de patogenitate. Virulenţa klebsielelor este foarte variată. Se întîlnesc tipuri saprofite şi tipuri de o virulenţă marcată. Virulenţa nu pare să fie legată de prezenţa capsulei, fiind descrise tulpini necapsulate cu o virulenţă accentuată.

Denis şi Martin au descris la animalele de laborator paralizii obţinute prin inocularea de filtrate de culturi de *Klebsiella*. Serotipurile 1-6 par să fie mai frecvent întîlnite în infecţiile respiratorii la om.

Boala la om. *Klebsiella pneumoniae* este izolată uneori singură sau în asociaţie, în procese pneumonice, influenza, bronşite, bronşiectazii, pleurezii, angine, rinite, otite etc. Acest germen a fost incriminat şi ca agent al unor conjunctivite, al ulcerelor serpiginoase ale corneei, ca şi al dacriocistitelor. Septicemii şi septico-piemii au fost de asemenea semnalate, acestea din urmă avînd ca punct de plecare fie o pneumopatie, fie procese supurative situate în diverse părți ale corpului, ca: apendicite, colecistite, pielo-nefrite, prostatite, endocardite, pericardite etc.

Klebsiella ozaenae a fost izolată din cazuri de ozenă, după cum *Klebsiella rhinoscleromatis* a fost izolată din secrețiile nazale ale indivizilor cu rinosclerom.

Boala spontană la animale. *Klebsiella pneumoniae* a fost incriminată în pneumonia contagioasă, cu septicemie consecutivă la cobai, oaie, cal, vițel, porc etc.

Boala experimentală. Șoarecele este animalul cel mai sensibil la infecția experimentală cu *Klebsiella pneumoniae*: inocularea unei mici cantități de cultură sau exsudat patologic, pe cale subcutanată, determină moartea animalului între 12 și 48 de ore. La autopsie se constată un exsudat la locul de inoculare, precum și generalizarea infecției în organe, cu focare necrotice în ficat și rinichi.

Cobaiul este mai rezistent. Inocularea pe cale intraperitoneală determină peritonită și moartea animalului între 20 de ore și 9 zile.

Iepurele prezintă un grad mai mare de rezistență decît șoarecele și cobaiul. Inocularea pe cale intravenoasă determină localizări în diferite organe.

Diagnosticul de laborator se bazează pe punerea în evidență a germenilor în produsele patologice.

Examenul direct pe frotiuri colorate permite cu ușurință recunoașterea klebsielelor, datorită particularităților lor morfologice (capsula).

Însămînțările pe medii obișnuite sau medii cu lichide organice permit obținerea germenilor în culturi care sînt apoi identificate pe baza caracteristicilor biochimice și eventual serologice.

Redăm în tabelul XLVII (după Wilson și Miles, 1957) diferențierile biochimice între *Kl. pneumoniae* *Kl. ozaenae* și *Kl. rhinoscleromatis*.

Tabelul XLVII

Subgrup	Glucoză	Maltoză	Manită	Lactoză în 3 zile	Zaharoză în 10 zile	Amigdalină în 4 zile	Inozitol	Adonitol	Lapte turnesolat	Roșu de metil	Voges-Proskauer	Creștere pe medii cu citrat	Creștere pe medii biliate	Hidroliza ureei
Kl. pneumoniae	+ gaz	+ gaz	+ gaz	+ gaz	+ gaz	+ gaz	+ gaz	+ gaz	acid reduce	+ −	+ −	+ −	+	+
Kl. ozaenae	+	+	+	+ tardiv	+ −	+ −	−	+	coagulează	+	−	+ −	+ −	+ −
Kl. rhinoscleromatis	+	+	+	−	+ gaz	−	+	+	acid + −	+	−	−	−	−

Identificarea tipurilor de *Klebsiella* se poate efectua folosind fenomenul de umflare a capsulei, cu ajutorul serurilor specifice de tip.

Epidemiologie. Infecțiile produse de *Klebsiella* la om sînt mult mai frecvent semnalate în ultima vreme, datorită probabil utilizării neadecvate a substanțelor antibiotice. Infecțiile urinare ca și complicațiile infecțioase ale intervențiilor chirurgicale sînt cele mai de temut. Aceste infecții împrumută caracterul infecțiilor intraspitalicești.

Genul (grupul) Aerobacter (Enterobacter)

Definiție. Germenii din grupul *Aerobacter*, care după clasificarea din 1963 a primit denumirea de *Enterobacter*, sînt bacili scurți, mobili, nesporulați, prezentînd sau nu capsulă, gram-negativi. Fermentează glucoza și lactoza, cu producere de gaz. Sînt larg distribuiți în natură.

Acest grup cuprinde 3 subgrupe, diferențiabile prin caracteristici biochimice; cele 3 subgrupe corespund de fapt celor 3 specii cunoscute sub numele: *Aerobacter cloacae*, *Aerobacter aerogenes* și *Aerobacter liquefaciens*.

Habitat. Răspîndiți în natură, se găsesc în apă, în lapte, în apa de canal și în sol. Sînt de asemenea întîlniți pe plante și în intestinul omului și animalelor.

Caractere morfologice. Bacili de 1—2 μ lungime și 0,5—1μ grosime apar de obicei izolați. *A. aerogenes* este frecvent încapsulat și imobil, pe cînd *A. cloacae* este de obicei mobil și neîncapsulat. Sînt gram-negativi.

Caractere de cultură. Cresc cu ușurință pe medii uzuale; tulbură bulionul, produc peliculă la suprafața mediului și sedimentează culturile degajînd un miros fecaloid. Pe geloză dezvoltă colonii convexe și adesea mucoide.

Caractere biochimice și de metabolism. Aerobi și anaerobi facultativ. Temperatura optimă de creștere este de 30—37°. Se dezvoltă și la 45°, ceea ce îi diferențiază de *Esch. coli*.

Redăm în tabelul XLVIII caracterele biochimice ale subgrupelor de *Enterobacter*.

Tabelul XLVIII

Grupul Enterobacter — Caracteristici biochimice

(*International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy, 1963, vol. 13, nr. 2, p. 79*)

	Subgrupe biochimice		
	A	B	C
Gaz din glucoză	+	+	+
Lactoză	+	+	(+)
Sucroză	+	+	+
Manitol	+	+	+
Dulcitol	—	—	—
Salicin	+	+	+
Adonitol	d	+	—
Inozitol (gaz)	—	+	(+)
Glicerol (gaz)	—	+	+
Celobioză (gaz)	+	+	—
Ramnoză	+	+	—
Rafinoză	+	+	+
Arabinoză	+	+	+
Xiloză	+	+	+
Sorbitol	+	+	+

Tabelul XLVIII (continuare)

	Subgrupe biochimice		
	A	B	C
Amidon (gaz)	—	—	(+) sau —
Indol	—	—	—
Roşu de metil	—	—	d
Voges-Proskauer	+	+	d
Amoniu citrat	+	+	+
Hidrogen sulfurat	—	—	—
Urează	—	—	—
Lichefierea gelatinei	(+)	d	+
Cultivare în mediu cu KCN	+	+	+
Malonat de sodiu	+	+	—
Fenilalanindezaminază	—	—	—
Lizindecarboxilază	—	+	(+)
Argininedihidrolază	+	—	—
Ornitindecarboxilază	+	+	+

Caractere de patogenitate. Sînt germeni saprofiţi, nu au fost incriminaţi ca agenţi patogeni pentru om. Pot fi patogeni pentru insecte.

Importanţa cunoaşterii acestor germeni este legată de cercetarea indicatorilor sanitari ai apelor poluate.

Genul (grupul) Hafnia

Constituit recent de către Møller (1954) ca un grup ubicvitar, poziţia sa în clasificaţia enterobacteriaceelor pare a nu fi definitiv stabilită. După opinia unor cercetători ar trebui ataşat grupului *Aerobacter*.

Caractere morfologice. Bacili gram-negativi, mobili la 20° sînt mai puţin mobili sau chiar imobili la 37°.

Caractere biochimice. Fermentează arabinoza, maltoza, ramnoza, trehaloza şi xiloza, nu fermentează adonita, dulcita, sorbita şi lactoza. Nu produc indol, nu lichefiază gelatina. Folosesc în mod variabil citratul, produc H_2S, încet sau slab. Reacţia roşului de metil şi Voges-Proskauer sînt variabile. Nu descompun ureea, reduc nitraţii în nitriţi.

Caractere de patogenitate. Nu s-au semnalat pînă în prezent infecţii la om produse de *Hafnia*.

Genul (grupul) Serratia

Definiţie. Germenii aparţinînd acestui grup sînt bacili mobili, de dimensiuni reduse, gram-negativi. Produc un pigment roşu caracteristic şi lichefiază prompt gelatina.

Specie tip: *Serratia marcescens* (sinonime: *Chromobacterium prodigiosum* sau *Micrococcus prodigiosus*).

Habitat. Sînt întîlniţi în ape, sol şi alimente. Au fost observaţi de asemenea la viermii de mătase şi alte insecte.

Caractere morfologice. Bacili scurţi, uneori cocobacili, apărînd de obicei izolaţi şi mai rar în lanţuri de 5—6 elemente.

Mobili, nesporulați, sînt gram-negativi, prezentînd adesea colorație bipolară.

Caractere de cultură. În bulion dezvoltă culturi luxuriante, cu un inel roșu sau o peliculă subțire la suprafața mediului și un depozit granular.

Pe geloză apar colonii rotunde de 1—2 mm diametru, de consistență untoasă, care capătă o culoare roșie în 3—4 zile. Pe gelatină dezvoltă colonii granulare care se pigmentează în roșu.

Caractere biochimice și de metabolism. Aerobi și facultativ anaerobi. Temperatura optimă de creștere este între 25 și 30°.

Fermentează uneori cu producere de gaz, glucoza, maltoza, manita, zaharoza, salicina și, ocazional, lactoza.

Nu produc indol, produc H_2S, dau reacția cu roșu de metil negativă și Voges-Proskauer pozitivă, reduc nitrații în nitriți.

Pigmentogeneza este favorizată de temperatura de 25—30° și nu se manifestă la temperaturi mai mari de 35°. Pigmentul de culoare roșie, denumit și prodigiozin, este solubil în alcool, cloroform, eter, benzen și în anumite condiții în apă.

Caractere de patogenitate. Germenii din grupul *Serratia* nu sînt patogeni pentru om și animale.

Genul (grupul) Proteus

Definiție. Germenii aparținînd acestui grup sînt de obicei mobili, nesporulați și neîncapsulați, gram-negativi, prezentînd o serie de caractere biochimice comune, printre care cel mai reprezentativ și constant caracter este capacitatea de a descompune ureea.

Istoric. Bacilul *Proteus* a fost descoperit de către Hauser care în 1885 l-a izolat din flora microbiană a materiilor organice în putrefacție.

Ciukievici în 1911 a descris fenomenul de invazie (cățărare).

În 1917, Weil și Felix au utilizat anumite tulpini de *Proteus* în diagnosticul serologic al tifosului exantematic. Cercetările efectuate cu această ocazie au constituit punctul de plecare al studiilor imunologice legate de structura antigenică a germenilor microbieni.

Rustigian și Stuart în 1945 au diferențiat pe baza caracterelor biochimice 4 subgrupe astăzi admise, și anume: *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Proteus morgani* și *Proteus rettgeri*.

Kauffmann și Perch (1951) au recomandat o schemă antigenică de diagnostic. În ultima vreme, germenii aparținînd acestui grup capătă din ce în ce mai mult un interes deosebit în patologia umană.

Habitat. Tulpinile de *Proteus* sînt foarte răspîndite în natură. Ele se întîlnesc de preferință în materiile organice în descompunere, ape poluate, ape de canal, bălegar, pămînt cultivat, materii fecale, alimente alterate (carne putrefiată, ouă etc.). Au fost de asemenea întîlniți în mari cantități, în scaunele bolnavilor cu afecțiuni intestinale ca: febră tifoidă, dizenterie, holeră și enterite de origini diverse.

Caractere morfologice. Germenii din grupul *Proteus* se prezintă sub formă de bastonașe scurte, de 1—3 μ lungime și 0,5—1 μ grosime sau, dimpotrivă, cu forme filamentoase, care ating 20—30 μ lungime. De un polimorfism accentuat, acești germeni pot produce cu ușurință și forme filtrabile (forme „L"), descrise de către Dienes și Klineberger.

Cu excepţia variantelor ,,O'' neciliate, germenii din grupul *Proteus* sînt foarte mobili, datorită cililor dispuşi *peritrich*. Sînt necapsulaţi, nesporulaţi, gram-negativi.

Caractere de cultură. Cresc cu uşurinţă pe medii de cultură. În bulion se dezvoltă rapid, tulburînd uniform mediul cu formare de văl la suprafaţă. Culturile exală un miros de putrefacţie. În apă peptonată, culturile au acelaşi aspect.

Pe geloză, formele mobile prezintă fenomenul caracteristic de invazie.

Însămînţînd germenii în apa de condensare a unui tub cu geloză înclinată, care este apoi incubat în poziţie verticală, se obţine după cîteva ore invadarea întregului mediu (fenomenul de căţărare).

Însămînţînd aceeaşi cultură în arie, în mijlocul unei plăci cu geloză, în interval de cîteva ore se obţine invadarea întregului mediu în cercuri concentrice.

Urmărit la microscop, fenomenul de invazie se caracterizează prin formarea unor arcade cu punctul de plecare de la marginea culturii, formate din bacili subţiri şi lungi, golurile delimitate de arcade fiind ulterior completate cu germeni. Din marginea stratului de cultură nou format, se detaşează alte arcade cu repetarea fenomenului.

Dacă se însămînţează pe aceeaşi placă 2 arii cu 2 tulpini diferite de proteu, invazia celor 2 tulpini se opreşte uneori la un moment dat, respectînd o linie de demarcaţie (Dienes). Linia de demarcaţie lipseşte dacă în cele 2 arii se însămînţează aceeaşi tulpină. Fenomenul liniei de demarcaţie a fost aplicat în scopuri epidemiologice de către Sturdza, Ţigoiu şi Vlădoianu. Nu se cunoaşte exact mecanismul fenomenului de invazie. Lominski şi Lendrum (1947) l-au explicat prin efectul chimiotactic negativ al metaboliţilor care se formează în perioada staţionară de creştere şi ar sili în acest fel germenii să evadeze în afara zonei de cultură, cînd concentraţia acestora a atins un nivel critic.

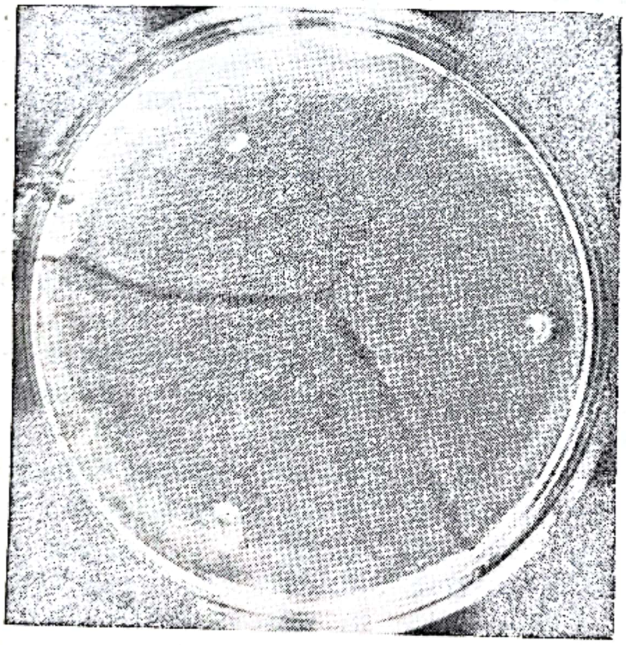


Fig. 106. — Fenomenul liniei de demarcaţie între 3 tulpini de *Proteus* de origini diferite.

Fenomenul de invazie poate fi inhibat prin încorporare la mediul de cultură a diferite substanţe printre care : preparate narcotice (cloral hidrat, morfină, feniletilbarbiturat de sodiu), alcool în proporţie de 5—6%, azid de sodiu în concentraţie finală de 1/5 000—1/10 000, acid boric 0,1%, acid carbolic, tripaflavină etc. De asemenea s-a recomandat încorporarea de ser polivalent ,,H'' anti-*Proteus*.

Variantele ,,O'' imobile dezvoltă pe geloză colonii rotunde, translucide, netede, bine delimitate. În afară de acest aspect care reprezintă forma ,,S'', se pot observa colonii granulare, opace, cu margini neregulate (forma ,,R'') sau colonii mici, abia vizibile cu ochiul liber (Felix, 1922).

Perch, cultivînd *Proteus* pe agar fenicat 1%, a obținut 2 feluri de colonii numite forma strălucitoare și forma turtită, constituite din germeni deosebiți, atît din punct de vedere morfologic, cît și al caracterelor de cultură, de structură antigenică și de patogenitate.

Caractere biochimice și de metabolism. Aerobi și facultativ anaerobi, germenii din grupul *Proteus* se dezvoltă între 10 și 43°, cu optimum de creștere între 34 și 37°.

Dotați cu un echipament enzimatic bogat și variat, fermentează cu producere de gaz numeroase zaharuri, printre care : glucoza, fructoza, galactoza. Nu fermentează lactoza, dulcita, dextrina.

În general produc indol, produc H_2S, dau reacția roșului de metil pozitivă, descompun ureea, reduc nitrații în nitriți, produc fenilalanin-dezaminază.

O serie de caractere biochimice servesc la diferențierea celor 4 subgrupe de *Proteus*.

Redăm în tabelul XLIX caracterele diferențiale ale acestor subgrupe biochimice.

Germenii din grupul *Proteus*, mai ales cei care provin din plăgi, ar produce o hemolizină nedifuzabilă și nefiltrabilă. Jacob (1932), folosind agar cu sînge de iepure, a pus în evidență hemoliză de tip β în 24—48 de ore.

Tabelul XLIX

Caractere biochimice	Proteus vulgaris	Proteus mirabilis	Proteus morganii	Proteus rettgeri
Maltoza	+g	—	—	—
Manita	—	—	—	+
Xiloza	+	+	—	—
Adonita	—	—	—	+
Salicina	+	X	—	+(V)
Inozita	—	—	—	+
Indol	+	—	+	+
H_2S	+	+	+	—
Gelatină	+	+	—	—
Citrat	V	V	—	+
Voges-Proskauer	—	±	—	—
Roșu metil	+	+	+	V
Ureea	+	+	+	+

Legenda : +g = fermentare cu producere de gaz
X = tardiv și neregulat
V = variabil

De asemenea s-a descris o protează activă la pH 8,4 în prezența ionilor de calciu și magneziu.

Rezistența la agenți fizici, chimici și biologici. Germenii din acest grup sînt distruși prin căldură umedă, la 60°, în timp de o oră. La temperatura laboratorului rămîn viabili 1—2 luni. În gheață, durata de supraviețuire este prelungită la cîteva luni.

Fenolul în concentrație de 1% îi distruge în 30 de minute.

Cît privește acțiunea antibioticelor, germenii din grupul *Proteus* sînt insensibili la penicilină, tetracicline și polimixină B. Sînt sensibili la kanamicină, cloramfenicol, inamicină.

Nestorescu, Popovici, Florescu și Bădulescu (1960) au pus în evidență un mod de comportare diferit la antibiotice, la tulpinile de *Proteus* izolate în mediu spitalicesc și cele izolate în ape, cele dintîi arătînd un spectru de sensibilitate mai restrîns.

Sînt sensibili la acțiunea bacteriofagilor specifici și sînt lizogeni în 43% din cazuri (Popovici, 1962).

Structura antigenică. Germenii din grupul *Proteus* se caracterizează printr-o marcată heterogenitate antigenică. Încă din 1917–1918, Weil și Felix au descris la acești germeni antigene somatice „O" și antigene flagelare „H". Winkle (1945) a pus în evidență 13 antigene „O" și 8 antigene „H". Pe baza prezenței acestor antigene, Winkle a diferențiat tulpinile de *Proteus* în 12 tipuri, pe care le-a notat cu simbolurile X2, X19, XK,XL și A-H. Kauffmann și Perch (1947) au stabilit o schemă antigenică de diagnostic, cuprinzînd 49 de grupe „O". Ulterior, Perch a detaliat studiul antigenic al primelor 30 de grupe „O".

Redăm în tabelul L schema antigenică de diagnostic pentru *Proteus vulgaris* și *mirabilis*, extinsă (după Perch).

O importanță deosebită din punct de vedere antigenic și de aplicabilitate epidemiologică prezintă variantele „X". Aceste variante, datorită relațiilor lor antigenice cu unii agenți ai febrelor exantematice, sînt aglutinabile în proporție ridicată de către serul bolnavilor cu aceste boli.

Weil și Felix au izolat în 1915, din urina și materiile fecale ale unui bolnav de tifos exantematic, un germen din grupul *Proteus*, care era aglutinat de serul bolnavilor de tifos exantematic pînă la titrul 1/200. Autorii l-au denumit *Proteus* X_2. Ulterior, ei au izolat un alt germen din grupul *Proteus*, care aglutina în prezența acestor seruri la un titru mult mai ridicat și pe care l-au numit X_{19}. Pe baza acestor observații, autorii de mai sus recomandau ca acest Proteus X_{19} să fie folosit ca antigen în diagnosticul serologic al tifosului exantematic. Această reacție serologică este cunoscută azi sub denumirea de reacția Weil-Felix. În 1917, Weil și Felix au arătat că tulpina X_{19} se poate disocia în 2 variante: una care invada întreaga suprafață a mediului și pe care au denumit-o „H" (Hauch = văl) și una care dezvolta colonii distincte și pe care au denumit-o „O" (ohne Hauch = fără văl). Inițialele „H" și „O" au rămas de atunci în terminologia imunologiei bacteriene.

Fletcher și Lesslar (1925, 1926), observînd în Malaia că nu toate serurile provenite de la bolnavi cu tifos exantematic aglutinează *Proteus* OX_{19}, s-au servit ca antigen de suspensia unui alt *Proteus*, denumit OX_K aglutinată de aceste seruri mai frecvent și la un titru mai ridicat. Ulterior s-a văzut că cele două tulpini – OX_{19} și OX_K – difereau prin structura lor antigenică și că tulpina OX_K era foarte prețioasă în diagnosticul serologic al febrei exantematice, cunoscută sub numele de febra *Tsutsugamushi*.

Studii importante au fost făcute în privința naturii chimice a factorilor existenți în aceste variante de *Proteus*, răspunzători de aglutinare în prezența serurilor bolnavilor cu febre exantematice.

Încă din 1929, Lim și Kurotkin au demonstrat că polizaharizii extrași din *Proteus* X_{19} sînt capabili să precipite cînd sînt puși în contact cu serurile care proveneau de la bolnavi cu tifos exantematic. Reacțiile de precipitare evoluau ca intensitate, paralel cu reacțiile de aglutinare.

Tabelul L

Grup „O"	Antigene „O"	Antigene „H"	Observații
1	1a	1a, 1b, 1c	Corespunde *Proteus* X_{19}
	1a, 1b	1a, 1b, 1d	Corespunde *Proteus* XL
2	2a	1a, 1b, 1c	Corespunde *Proteus* X_2
3	3a, 3b	1a, 1c, 1e	Corespunde *Proteus* X_K
	3a, 3b	2a, 2b, 2e, 2f	
	3a, 3b	2a, 2c, 2e	
4	4a, 4b	1a, 1b, 1d	
	4a, 4c	8a	
	4a, 4c	16a	
5	5a, 5b	1a, 1c, 1e	
	5a, 5c	1a, 1c, 1e	
	5a, 5c	3a, 3b …	
6	6a	1a, 1c, 1e	
	6a	2a, 2b, 2e, 2f	
	6a	3a, 3b …	
7	7a, 7b	1a, 1d, 1e, 1f	
	7a, 7c	3a, 3b…	
	7a, 7b	4a, 4b, 4c	
8	8a	1a, 1b, 1c	
9	9a	1a, 1c, 1e	
	9a	2a, 2c, 2e	
10	10a	1a, 1c, 1e	
	10a	2a, 2c, 2e	
	10a	3a, 3b…	
	10a	4a, 4b, 4x	
	10a	5a	
11	11a, 11b	1a, 1c, 1e	
	11a, 11b, 11c	2a, 2b, 2e, 2f	
	11a, 11b	2a, 2b, 2c, 2f	
	11a, 11d	3a, 2b…	
	11a, 11b	6a	
12	12a	1a, 1b, 1c	
	12a	2a, 2c, 2e	
13	13a	1a, 1c, 1e	
	13a	2a, 2c, 2e	
	13a	3a…	
	13a	4a, 4c, 4d	
14	14a, 14b	1a, 1c, 1e	
	14a, 14c	3a, 3b…	
15	15a	1a, 1b, 1d…	
	15a, 15b	7a	
16	16a	1a, 1c, 1e	
	16a, 16b	9a	
	16a, 16b	14a	
17	17a, 17b	1a, 1c, 1e	
	17a, 17c	10a	
18	18a	1a, 1c, 1e	
19	19a, 19b, 19c	1a, 1b, 1c	
	19a, 19c, 19d	1a, 1c, 1e	
	19a, 19c	3a, 3b …	
	19a, 19b, 19c	11a	
20	20a	1a, 1c, 1e	
	20a	2a, 2c, 2e	
21	21a	1a, 1b, 1c	
22	22a	1a, 1b, 1c	
23	23a, 23b	1a, 1c, 1e	
	23a,23c,23d	2a, 2b, 2e, 2f	
	23a,23c	2a, 2d, 2f	
	23a, 23c, 23d	3a, 3b…	
	23a, 23c	12a	
24	24a	1a, 1c, 1e	
	24a	3a, 3b…	
	24a	4a, 4b, 4e	
	24a	13a	
25	25a	1a, 1b, 1c	
26	26a, 3b	2a, 2c	
	26a, 3b	3a…	
	26a, 3b	6a	
27	27a	2a, 2c, 2e	
	27a	3a, 3b…	
28	28a	2a, 2c, 2e	
	28a	3a, 3b…	
29	29a	13a	
30	30a	1a, 1c, 1e	
	30a	2a, 2b, 2e, 2f	
	30a, 30b	2a, 2c, 2e	
	30a	4a, 4b, 4e	
	30a	13a	
	30a	15a	

În 1933, Bruce White reia cercetările asupra naturii chimice a antigenelor de *Proteus* și arată că antigenul „O” este termostabil și este constituit din doi receptori serologici distincți : un receptor alcali-labil care este răspunzător de aglutinare cu serul anti-*Proteus* și un receptor alcali-stabil răspunzător de reacția Weil-Felix (cu serul bolnavilor de tifos exantematic).

Un an mai tîrziu, Castaneda fixează raporturile între germenii *Proteus* X și Rickettsii. Printr-o tehnică proprie, acest autor obține din *Proteus* X_{19}, două substanțe, pe una numind-o factorul „X” și pe cealaltă factorul „P”. Factorul X este capabil să dea reacții specifice, atît cu serul aglutinant preparat cu X_{19}, cît și cu serul bolnavilor de tifos exantematic, pe cînd factorul „P” dă reacții specifice numai cu serul X_{19}.

L. Mesrobeanu a arătat că antigenul glucido-lipidic, extras la rece cu ajutorul acidului tricloracetic, precipită în prezența serurilor bolnavilor de tifos exantematic ca și a serurilor imune anti-*Proteus*. El pare să fie similar cu factorul X a lui Castaneda. Ciucă și colaboratorii socotesc antigenul glucido-lipidic ca factor răspunzător al reacției Weil-Felix.

Din toate aceste cercetări reiese constatarea că există o înrudire antigenică între *Proteus* X și unele Rickettsii, care arată rolul reacției Weil-Felix în diagnosticul serologic al febrelor exantematice.

Caractere de patogenitate : germenii din grupul *Proteus* posedă o slabă capacitate de invazie în organism, deși sînt semnalate, mai ales în epoca antibioticelor, un număr de septicemii cu acești germeni.

Un rol mai important în conferirea caracterelor de patogenitate par a avea componentele toxice. Astfel s-a descris o toxină solubilă care, inoculată în peritoneul cobaiului, provoacă moartea acestuia, precum și endotoxine termostabile. Ciucă și colaboratorii au demonstrat caracterul enterotrop al endotoxinei, administrată la om pe cale intradermică.

Boala la om. Deși, în general, germenii aparținînd grupului *Proteus* sînt întîlniți sub formă de germeni saprofiți sau comensali, ei sînt totuși răspunzători de unele procese inflamatoare și supurative ale omului.

Importanța lor în patologie a crescut o dată cu folosirea substanțelor antibiotice. Acestea, ca și la alți germeni, determină selecționarea lor în mediul spitalicesc (Nestorescu, Popovici și colaboratorii, 1963), putînd apărea infecții cu aspect epidemic. Au fost semnalați și ca agenți etiologici ai unor toxiinfecții alimentare (Azbelev, Kaden și Kasianova, Cherry și colaboratorii etc.).

Germenii *Proteus* au fost izolați și din septicemii.

Boala la animale. Jensen (1913) i-a considerat agenți cauzali ai dizenteriei epidemice a viților. De asemenea au fost incriminați în etiologia unei infecții epidemice la pești.

Infecția experimentală. Germenii din grupul *Proteus* în general sînt patogeni pentru animale de laborator.

Administrarea pe cale subcutanată a 2 ml cultură de 24 de ore în bulion determină la iepure formarea unui abces, cu moarte în 4 zile. Administrarea pe cale orală la iepurii nou-născuți provoacă fenomene diareice însoțite de pierdere în greutate și uneori moarte.

Administrarea culturii de 24 de ore la cobai, pe cale intraperitoneală sau intravenoasă, duce la moartea animalelor în cîteva zile.

Inocularea șobolanilor și șoarecilor pe cale intraperitoneală provoacă moartea animalelor în 18-48 de ore.

Imunitatea. Imunitatea în infecțiile cu *Proteus* este puțin cunoscută. Se știe numai că animalele infectate experimental și care supraviețuiesc par să prezinte o sensibilitate particulară (fenomene alergice).

Diagnosticul de laborator

Se bazează pe izolarea și identificarea germenilor din produsele patologice și alimente. Produsele patologice pot fi : materii fecale, urină, sînge, exsudate purulente.

Conduita diagnosticului bacteriologic. Examen direct pe frotiuri colorate prin metoda Gram (în cazul urinii și exsudatelor purulente).

— Însămînțări în lichidul de condensare a 1-2 tuburi cu geloză înclinată, cu incubare în poziție verticală, 24 de ore la 37°, precum și pe medii diferențiale.

— Identificarea culturilor obținute se efectuează prin : a) studiul caracterelor morfologice prin frotiuri colorate cu ajutorul metodei Gram ; b) cercetarea aspectului culturilor pentru fenomenul de invazie ; c) în cazul cînd se constată puritatea culturii, se procedează la cercetarea proprietăților biochimice (fermentarea zaharurilor, capacitatea de desfacere a ureei, producerea de hidrogen sulfurat, producția de indol, lichefierea gelatinei, cultivarea pe medii cu citrat) ; în raport cu aceste proprietăți, se stabilește subgrupul biochimic, folosind schemele recomandate.

Dacă la prima însămînțare cultura nu este pură, se repetă operația, însămînțîndu-se în apa de condensare a unor noi tuburi de geloză, germenii din partea superioară a primei culturi ; d) studiul caracterelor serologice după schema antigenică de diagnostic a lui Kauffmann și Perch, folosind seruri aglutinante potrivite.

Epidemiologie

O dată cu folosirea pe scară largă a substanțelor antibiotice, se constată o selecționare a anumitor tulpini de *Proteus*. Aceste tulpini par să aparțină mai cu deosebire anumitor tipuri serologice, prezentînd totodată și o rezistență multiplă pentru numeroase antibiotice.

Astfel, printre tipurile serologice mai frecvent întîlnite în infecțiile urinare, Nestorescu, Popovici, Florescu și Bădulescu (1960, 1963) au identificat tipurile O_3H_1, O_9H_3 și $O_{32}H_3$. Aceste tipuri serologice erau multiplu rezistente, fiind sensibile numai la neomicină, kanamicină, inamicină și cloramfenicol.

Epidemiologia enteritelor infantile este încă insuficient cunoscută Grupul *Proteus*, întîlnit rar în flora intestinală a copiilor sănătoși (Vogulkina) este semnalat în enterite de numeroși cercetători ca : Laurinich, Andreoni, Williams, Mecinikov etc. Subgrupul de *Proteus* mai des întîlnit în aceste sindroame pare a fi *Proteus morgani*.

Nestorescu, Popovici și colaboratorii (1956), studiind etiologia enterocolitelor infantile la diferite grupe de vîrstă, au găsit o incidență mai ridicată a germenilor din grupul *Proteus* la grupa de vîrstă 0-3 luni (12%), scăzînd la grupele mai mari, pentru a ajunge la vîrsta de un an la o incidență de 4,3%.

Rolul etiologic al grupului *Proteus* în producerea toxiinfecțiilor alimentare este încă discutat, dată fiind larga răspîndire a acestor germeni în natură.

Proporția toxiinfecțiilor alimentare în care s-au incriminat germenii din acest grup este sub 1% din incidența generală a acestor sindroame.

Genul (grupul) Providencia

Kauffmann, în 1951, a propus includerea în subgrupul *Providencia* a unor tulpini izolate din materii fecale sau urină și care aveau proprietăți intermediare între grupul *Shigella* și grupul *Proteus.*

Habitat. Tulpini de *Providencia* pot fi găsite în conținutul intestinal al omului normal sau în diferite cazuri de enterită, sau în infecții urinare.

Caractere morfologice. Bacili gram-negativi, în genere mobili.

Caractere de cultură. Cresc pe medii obișnuite de cultură.

Caractere biochimice și de metabolism. Fermentează glucoza, cu sau fără producere de gaz. Cu unele excepții, nu fermentează lactoza. Fermentează frecvent dar tardiv zaharoza și adonitolul. Produc indol și nu produc H_2S. Nu lichefiază gelatina, nu hidrolizează ureea, dar folosesc citratul ca unică sursă de carbon. Reacția roșului de metil este pozitivă. Reacția Voges-Proskauer este negativă. Elaborează fenilalanindezaminază și cultivă în prezența KCN.

Structură antigenică. Serologic au fost identificate de către Edwards și Ewing 156 de serotipuri pe baza antigenelor somatice și flagelare.

Caractere de patogenitate. Dotate cu potențialități de patogenitate, tulpinile *Providencia* au fost incriminate în unele infecții ale tractului urinar, precum și în izbucniri sau cazuri sporadice de enterite la om.

Diagnosticul de laborator se efectuează în condiții asemănătoare cu ale celorlalte enterobacteriacee.

Vibrionul holeric

Prof. N. Nestorescu

Vibrionul holeric sau *Vibrio comma*, agentul cauzal al holerei asiatice, aparţine genului *Vibrio* care, împreună cu alte genuri, aparţine familiei *Spirillaceae*.

Vibrionul holeric este morfologic asemănător cu numeroase alte specii de vibrioni, nepatogene, aparţinînd genului *Vibrio* şi de care trebuie diferenţiat în vederea diagnosticului.

Istoric. Cunoscută, se pare, din vremea lui Hipocrate, europenii au cunoscut holera abia în 1498, cînd au debarcat pentru prima oară în India, unde boala era endemică cu multe secole înainte. În Europa boala a apărut pentru prima oară în 1817, iar în America în 1832. Incriminat de Pacini în 1854, vibrionul holeric a fost descoperit şi izolat de Koch, în 1883. Pandemiile de holeră care au urmat de la această dată, deosebit de omorîtoare, au afectat rînd pe rînd toate regiunile globului; iată pentru ce Beard a declarat că „holera a fost cel mai straşnic profesor, care a obligat întreaga lume să ia măsuri de sanitaţie în colaborarea cea mai perfectă”. În 1894, Pfeiffer şi Isaeff au observat fenomenul de vibrioliză, iar Bordet în 1898 demonstrează mecanismul acestui fenomen.

Habitat. Omul este singura gazdă a vibrionului holeric. În anumite condiţii poate fi întîlnit în ape şi sol.

Caractere morfologice şi tinctoriale. Vibrionul holeric se prezintă ca un bacil uşor incurbat, ca o virgulă, de 2—3 μ lungime şi 0,4—0,6 μ grosime. Morfologia sa este variabilă, după cum studiem acest agent în scaunele bolnavilor, în culturi (lichide sau solide) sau în natură (sol, rîuri, alimente). În intestin se poate întîlni de la formele cocoide pînă la formele filamentoase, ceea ce îl face deseori greu de suspectat. În culturi, vibrionii pot să se înfăţişeze de la formele granulare pînă la forme lungi. Vibrionul este extrem de mobil; este, poate cel mai mobil din toţi germenii patogeni cunoscuţi. Mobilitatea este datorită unui cil unic, de două-trei ori mai lung decît vibrionul, situat la una din extremităţile sale. Este nesporulat şi neîncapsulat. Se colorează uşor cu culorile de anilină — este gram-negativ.

Caractere de cultură. *Medii lichide*: în apa peptonată, vibrionul holeric se dezvoltă foarte repede; numai după cîteva ore de incubaţie (5—6 ore) se poate vedea că mediul a devenit opalescent şi un văl discret apare la suprafaţa tubului. Acest văl este format dintr-o masă foarte densă de vibrioni. Aceleaşi caracteristici le oferă apa peptonată şi în cazul însămînţării cu dejecţii holerice.

În bulion, de preferinţă preparat după procedeul Martin, vibrionul holeric proliferează activ; după cîteva ore mediul este tulbure, fără văl la suprafaţă şi fără depozit la fund, degajînd un miros caracteristic.

Laptele şi zerul neutralizat sînt medii de cultură în care vibrionul holeric creşte bine pînă ce acestea devin acide; laptele poate fi uneori coagulat.

Medii solide. Geloza alcalină oferă o cultură de vibrioni holerici, în cîteva ore. Coloniile izolate sînt de obicei rotunde, uşor bombate, albăstrui, mici, cu un diametru de 1—3 mm. Bălteanu a descris trei feluri de colonii: unele de formă „R", altele avînd un centru opac şi o periferie transparentă şi, în fine, ultimele net opace.

Azi se cunosc la vibrionii holerici forme de colonii „S", „R" şi colonii care conţin germeni cu degradare intensă, denumite colonii „ρ".

Gelatina este deseori lichefiată; lichefierea poate fi rapidă sau lentă. Vibrionul holeric, însămînţat pe gelatină în plăci Petri, prezintă, după 24 de ore de incubare, colonii de dimensiuni mari cu centru lichefiat, caracteristic.

Cartoful se prezintă ca un foarte bun mediu de cultură, vibrionii holerici proliferînd activ. După 24—48 de ore de la însămînţare se obţin colonii brune, groase şi vîscoase.

Geloza cu sînge potasat (mediul Dieudonné), bine preparată, permite dezvoltarea rapidă a vibrionului holeric; după 6—8 ore încep să se zărească pe suprafaţa mediului colonii fine, ca picăturile de rouă, translucide, rotunde, bombate. Mai tîrziu, coloniile se întind pe suprafaţa mediului, devenind opace, cenuşii, cu diametrul de 4—5 mm.

Caractere biochimice şi de metabolism. Vibrionul holeric este un germen care creşte foarte bine în mediu aerob, creşte slab sau deloc în condiţii anaerobe. Se dezvoltă bine în limite largi de pH şi mai ales la pH aproximativ 8. Temperatura de creştere este variabilă, culturi se obţin şi la 24°, însă temperatura optimă este la 37;5°.

Vibrionul holeric produce H_2S şi indol. Nitraţii sînt reduşi în nitriţi şi cînd e adăugat acid sulfuric la cultura dezvoltată în apă peptonată, nitratată, se obţine o culoare roşie. Este reacţia clasică „holera-rot", reacţie nespecifică. Formează catalază şi amoniac. Poate să reducă albastrul de metilen.

Vibrionii holerici fermentează fără gaz, glucoza, fructoza, zaharoza, galactoza, maltoza şi manita. Lactoza este fermentată tardiv (2 săptămîni); salicina este fermentată excepţional. Nu atacă inulina şi dulcitolul.

Heiberg, studiind acţiunea fermentativă asupra manozei, zaharozei şi arabinozei, pe 368 de tulpini de vibrioni de provenienţă diferită, a putut să-i claseze în 6 grupe separate (vezi tabelul LI).

Este dovedit azi că tulpinile autentice de vibrioni holerici aparţin grupului fermentativ I; această reacţie fermentativă constituie un auxiliar de mare importanţă pentru identificarea vibrionului holeric. Constatări similare, dar nu identice au fost făcute în țara noastră de către C. Combiescu. Unii vibrioni holerici sînt capabili să producă o hemolizină solubilă, termolabilă (vibrioni El-Tor și tulpinile Celebes); majoritatea vibrionilor holerigeni însă digeră pigmentul sanguin cu ajutorul unei proteidaze (Bernard, 1937). Vibrionii holerici posedă de asemenea, o serie de alte enzime, active în mediu alcalin, cum sînt colagenazele, lecitinazele, elastinazele și mucinazele. Această ultimă enzimă are o activitate marcată asupra descuamării mucoasei intestinale, explicîndu-ne pînă la un punct unele aspecte de patogenie a acestei boli.

Tabelul LI

Grupul	Zaharurile		
	Manoza	Zaharoza	Arabinoza
I	+	+	−
II	−	+	−
III	+	+	+
IV	−	+	+
V	+	−	−
VI	−	−	

Rezistența la agenți fizici și chimici. Vibrionii holerici sînt mult mai sensibili la acțiunea luminii solare decît majoritatea celorlalți germeni patogeni. Razele ultraviolete îi ucid foarte repede.

Temperatura de 50° omoară vibrionul holeric în 60 de minute, la temperatura de 100° este distrus instantaneu; lumina solară nu îi omoară decît după 10 ore. Razele ultraviolete îi distrug în 10-45 de minute; supraviețuiește ușor în ape de izvor, rîuri, fluvii; după unii autori, se și înmulțește în aceste ape; trăiește de asemenea și în apa de mare. În alimente, cu unele excepții, vibrionul trăiește puține zile (lapte) sau numai cîteva ore (portocale). În anumite condiții, poate să se mențină în intestinul bolnavilor mai multe săptămîni. Foarte sensibil la antiseptice. Concentrațiile obișnuite de fenol și formol îl omoară în cîteva minute. Sublimatul, chiar în diluție de 1 :100 000, îl omoară în mai puțin de 5 minute. Laptele de var 20% are o acțiune puternică vibriocidă; de asemenea, clorul liber. Derivatul 6 257 (p-aminobenzensulfonamidtiazol + formaldehidă) este activ *in vitro* și *in vivo*.

Penicilina nu oprește creșterea vibrionilor holerici; sulfamidele au o acțiune moderată; streptomicina se arată activă; sînt sensibili la bacteriofag.

Structura antigenică. În 1935, Linton și colaboratorii au putut extrage din vibrioni două proteine,calitativ dinstincte: proteina I și II. Pe de altă parte aceiași autori izolează și trei polizaharizi, denumiți I, II și III, care există în corpul vibrionilor sub formă de compuși acetilați, conținînd respectiv galactoză, arabinoză și glucoză. Pe baza proteinelor și polizaharidelor izolate, Linton și colaboratorii au făcut o clasificație chimică a grupului vibrionilor în 6 clase (vezi tabelul LII).

Tabelul LII

Clasă	Proteină	Polizaharid
I	I	I
II	I	II
III	II	II
IV	II	I
V	II	III
VI	I	III

După acești autori, vibrionii holerici autentici posedă proteina I și polizaharizii care conțin arabinoză și galactoză.

În 1936, White, studiind polizaharizii în formele „S”, „R” și „ρ” ale vibrionilor a pus în evidență un număr de polizaharizi denumiți Cα,

$C\beta$, $C\gamma$ şi $C\delta$. Polizaharidul $C\alpha$ este dominant în formele „S”, polizaharidul $C\beta$ este dominant în forma „R”, iar polizaharidul $C\delta$ în forma de degradare „ρ”. Toţi aceşti polizaharizi pot stimula producerea de anticorpi la iepurii imunizaţi cu ajutorul culturilor vii de vibrioni.

În prezenţa serurilor aglutinante preparate cu vibrioni holerigeni, vibrionii se împart în vibrioni aglutinabili şi vibrioni inaglutinabili. Existenţa tipurilor imunologic definite în grupul vibrionilor aglutinabili a fost făcută de Kabeshima, în 1912, care a descris, cu ajutorul serurilor adsorbite două tipuri de vibrioni holerigeni, denumite tipul I, original sau Inaba şi tipul II, variabil sau Ogawa. În 1923, Nobechi identifică un al treilea tip, denumit intermediar sau Hykojima.

O cotitură în studiul structurii antigenice a vibrionilor holerici a fost efectuată de către Bălteanu, în 1926, care a pus în evidenţă la vibrionii holerici două antigene—antigenul „O” şi antigenul „H”. În acelaşi timp, Bălteanu dovedeşte că aglutininele anti-„O” sînt mai labile decît cele „H”. Ceva mai tîrziu s-a arătat că antigenul „O” este specific, pe cînd cel „H” s-a dovedit nespecific. Acest ultim antigen nu joacă rol în identificare. În 1935, Gardner şi Venkatraman, studiind relaţiile imunologice ale vibrionilor holerigeni şi neholerigeni, au arătat că vibrionii, pe baza antigenului „O”, pot fi împărţiţi în 6 grupe, desemnate „OI”, „OII” etc. pînă la „OVI”. Cu această ocazie s-a arătat că grupa „OI” cuprinde mai toate tulpinile de vibrioni autentici holerigeni, pe cînd cei neholerigeni erau clasaţi în celelalte grupe („OII”—„OVI”). Din grupa „OI” fac parte atît vibrionii holerici nehemolitici (Inaba, Ogawa şi Hykojima), cît şi vibrionii hemolitici cunoscuţi sub numele de vibrioni El-Tor şi Celebes.

În 1946, Burrows şi colaboratorii, analizînd structura antigenică a vibrionilor, au pus în evidenţă 13 factori antigenici „O”, pe care i-au etichetat cu literele majuscule ale alfabetului : A, B, C etc. pînă la M. După frecvenţa şi importanţa lor au fost împărţiţi în factori majori (A, B, C, D, E) şi factori minori (F, G, H, I, J, K, L, M). Dintre cei 5 factori majori, cel etichetat cu A, nu a fost întîlnit decît la vibrionii „OI” ai lui Gardner şi Wenkatraman, ceea ce a dus la concluzia că acest factor este specific vibrionilor holerici autentici. Ceilalţi factori (B-M) pot fi asociaţi vibrionilor holerici, dar ei nu au imortanţă decît pentru serotipajul impus de investigaţiile epidemiologice. Cele trei tipuri de vibrioni holerici—Inaba, Ogawa şi Hykojima—au formula antigenică următoare : primul AC, al doilea AB, iar al treilea ABC. S-a putut pune în evidenţă şi un vibrion holeric numai cu factorul antigenic A. Factorii antigenici D-M pot să se adauge în mod variabil la tipurile autentice de vibrion holeric.

Tabelul LIII

Tip Inaba	Tip Ogawa	Tip Hykojima
AC	AB	ABC
ACD	ABEFIKL	ABCEL
ACE	—	ABCFL
ACDE	—	ABCDEF
ACDF	—	ABCDEL
ACDEFL	—	ABCFIKL
ACDEFLM	—	ABCDEHIKLM

Redăm în tabelul LIII formulele antigenice întîlnite de Burrows pe diferite tulpini de vibrioni holerici aparţinînd celor trei tipuri serologice stabilite de autorii japonezi.

Cercetările lui Burrows au scos în evidenţă printre altele, două concluzii importante :

1. Vibrionii holerici conţin totdeauna factorul antigenic A, ceea ce arată că pentru identificarea lor este suficient să avem la îndemînă numai un ser monospecific vibrion holeric anti-A.

2. Tulpinile de vibrioni holerici necesare pentru prepararea vaccinurilor antiholerice trebuie să conţină numaidecît acest antigen; de asemenea, ele trebuie izolate, de preferinţă, din focarul pe care îl asanăm.

Celelalte antigene majore (B-E), ca şi antigenele minore (F-M) se întîlnesc ca antigene specifice la vibrionii neholerigeni sau ca antigene suplimentare la vibrionii holerigeni.

Vibrionii holerici posedă antigene comune cu brucelele şi salmonelele (*S. enteritidis*).

Caractere de patogenitate. După Nicolle, virulenţa vibrionilor holerici este reprezentată prin puterea lor de a vegeta *in vivo*; ea este extrem de variabilă. După observaţiile lui Zlatogorov, un număr mare de vibrioni, izolaţi din scaunele şi intestinul holericilor, sînt lipsiţi de virulenţă. Virulenţa vibrionilor holerici variază chiar în cursul aceleiaşi epidemii; tulpinile izolate la începutul şi sfîrşitul epidemiei sînt mai atenuate; ea poate varia, de asemenea, la diversele tulpini izolate din acelaşi scaun şi din aceeaşi ansă intestinală (cadavru). Creşterea virulenţei vibrionilor holerici poate fi obţinută în laborator (prin cultivare în peritoneul cobailor vaccinaţi specific).

Cît priveşte toxigeneza vibrionilor holerici, ea pare să fie legată de endotoxină. Au fost obţinute din tulpinile de vibrioni holerici (Inaba şi Ogawa) preparaţii de endotoxine cu activitate marcată (500 DL_{50}/mg). Aceste preparaţii dializează repede şi par de natură lipidică. Bernard şi Grabar au obţinut din vibrionii holerici două toxine, care pot fi separate prin ultrafiltrare. Una din acestea, de natură glucido-lipidică, este enterotropă, cealaltă, de natură proteică, are acţiune neurotropă (hipotermizantă).

Puterea de invazie a vibrionilor holerici este neînsemnată; Cantacuzino, din 53 de cazuri cercetate, a obţinut hemoculturi pozitive doar în 5 cazuri. Burnet a descris, în complexul toxic al vibrionului holeric, o mucinază care are proprietatea să mărească permeabilitatea mucoasei intestinale la diferite substanţe toxice.

Phillips a dovedit că vibrionul holeric ar inhiba schimbul apei şi electroliţilor între plasma sanghină şi lumenul intestinal, printr-un inhibitor pe care acest germen îl elaborează.

Variabilitate. Vibrionul holeric este un germen microbian care se supune, cu uşurinţă, fenomenelor de variaţie. Caracterele variantelor pot fi uneori corelate, alteori nu; din această cauză putem întîlni în natură un număr deosebit de mare de variante. Factorul esenţial de variaţie a vibrionului holeric este bacteriofagul holeric. Sub acţiunea acestuia, Doorenbos şi Pasricha au obţinut variante ca: nehemolitice, nelizogene şi aglutinabile; hemolitice, aglutinabile, lizosensibile sau lizorezistente; neaglutinabile, hemolitice şi nehemolitice; forme filtrabile etc.

Boala la om. Holera este o toxiinfecţie specifică speciei umane. Calea de intrare este tubul digestiv, urmată de o multiplicare intensă a vibrionilor holerici pe mucoasă şi mai ales în submucoasa intestinului subţire, care se transformă într-o adevărată cultură *in vivo*.

După o incubaţie de 1—5 zile, apar brusc simptome intestinale variate, de la forma uşoară pînă la forma gravă, ca diaree apoasă fără tenesme, în cantitate de 5—8 litri/zi, scaune riziforme, vărsături, precum și simptome legate de starea generală, ca *facies* caracteristic, algiditate, bradicardie, slăbire, cianoză, crampe musculare, hipotermie, uremie, stare comatoasă, urmată de moarte. Se constată uneori forme rapid fatale, fără vărsături și diaree (*holera sicca*). La necropsie se constată o congestie puternică a intestinului subțire, de culoare „hortensia", intensă descuamare și necroză epitelială, conținut apos riziform, leziuni în rinichi și ficat. Mortalitatea este de peste 50%; cei vindecați pot deveni excretori de vibrioni pe o durată de 5—6 săptămîni.

Cercetări asupra transmiterii holerei la om au fost efectuate de către Foy, Ferran, Mecinikov, Pettenkofer și alții, care au administrat vibrioni holerici la voluntari, după prealabilă alcalinizare a sucului gastric. Unii voluntari au prezentat hipotermie, vărsături, crampe, diaree; s-au pus, de asemenea, în evidență vibrioni în scaune.

Infecția experimentală la animale a fost încercată de foarte multă vreme. Se pare că numai maimuța, spermofilul, iepurele nou-născut și cobaiul pot fi folosiți în acest scop.

Mecinikov și Violle, utilizînd, fie maimuțele antropomorfe, fie maimuțele inferioare, cărora li se administrau mai întîi un purgativ drastic și apoi vibrioni holerici, au obținut, în aceste condiții de experiență, holera algidă mortală. La autopsie au găsit intestinul subțire congestionat, cu un conținut format din mucus, lichid alburiu, ca apa de orez, în care înota o cantitate enormă de vibrioni.

Spermofilul, după experiențele din Rusia ale lui Zabolotni, este foarte sensibil la holeră. Alimentele obișnuite, cărora li s-au adăugat vibrioni holerici, sînt suficiente să ducă la moartea animalelor, cu diaree, crampe, cianoza extremităților și algiditate. Vibrionii holerici se găsesc în conținutul intestinal, peritoneu și chiar în circulație.

Iepurii nou-născuți, în vîrstă de 2—4, zile au fost folosiți de Mecinikov. După administrare de vibrioni holerici, animalele prezintă tremurături, diaree, anurie și algiditate. La necropsie se găsește în intestinul subțire conținut riziform, foarte bogat în vibrioni, care prin treceri succesive devine extrem de virulent.

Cobaiul, cu conținutul stomacal alcalinizat și intestinul iritat cu ajutorul podofilinei (procedeul lui Cantacuzino și Marie), infectat pe cale orală, prezintă o diaree apoasă, bogată în vibrioni, temperatura scăzînd la 35—33°, cu moarte consecutivă. La autopsie se întîlnesc congestie, hiperemia mucoasei gastrice și conținut riziform, în care înoată numeroși vibrioni.

Imunitate. Pentru cauze încă necunoscute, unii oameni au o accentuată rezistență naturală la holeră; de asemenea, o imunitate dobîndită printre oamenii trecuți prin boală și vindecați se poate constata, cel puțin pentru perioada epidemică în care s-au îmbolnăvit (Harvey, 1929). Holera cu evoluție lentă pare să dea o imunitate mai pronunțată decît formele acute și scurte (Violle). După Raffel, puterea protectoare se manifestă față de endotoxinele holerice.

Diagnosticul de laborator al holerei

Ținînd seama că nici o boală transmisibilă nu prezintă manifestări de extensivitate așa de mari ca holera, diagnosticul bacteriologic al primelor cazuri clinice trebuie făcut cu maximum de urgență; pentru același motiv, controlul bacteriologic al convalescenţilor şi contacţilor trebuie efectuat cu aceeaşi rapiditate, pentru a se putea face la timp triajul şi carantinarea suspecţilor şi a fi scutiţi de surprize epidemiologice, din cele mai grave.

Recoltarea scaunelor bolnavior se face în colectoare care vor fi aşezate în cutii de tablă şi expediate la laborator cît mai curînd posibil. În perioada acută a bolii, materiile fecale vor fi însămînțate direct ; materiile fecale de la convalescenţi şi contacţi vor fi recoltate în soluţii conservante, printre care cea recomandată de O.M.S. este următoarea :

Se dizolvă 12,405 g acid boric şi 14,912 g clorură de potasiu în 800 ml de apă caldă ; se lasă să se răcească şi se aduce la 1 000 ml. Se iau 250 ml din această soluţie şi se amestecă cu 133,5 ml sodă caustică N/5 şi se aduce la 1 000 ml. Se adaugă 20 g sare de bucătărie ; se filtrează totul pe hîrtie şi se repartizează cîte 10 ml în flacoane de 30 ml, prevăzute cu capac cu ghivent. Se sterilizează la 120°, 60 de minute. Soluţia are pH 9,2 (Venkatraman şi Ramakrishnan, 1941). Se adaugă materii fecale în lichidul conservant cam cît două degetare ; aceeaşi cantitate de vărsături sau 2—3 cm^2 din rufe murdărite de fecale.

Recoltarea fecalelor la persoane în trecere prin zona epidemică poate fi făcută după metoda amestecului fecalelor provenite de la 10 indivizi ; în eventualitatea că un amestec este pozitiv, se repetă şi se individualizează analizele pentru toate cele 10 persoane de la care au fost recoltate materiile fecale (metoda Shahim).

Examenul macroscopic al scaunelor holericilor, deşi trebuie în permanenţă efectuat, nu oferă totdeauna aspecte caracteristice ; deseori, vibrionii holerici pot fi izolaţi din scaune necaracteristice după cum, uneori, nu pot fi izolaţi din scaune tipice.

Prima fază a diagnosticului bacteriologic este cercetarea mobilităţii vibrionilor cu ajutorul unui preparat între lamă şi lamelă ; după aceasta se confecţionează frotiuri foarte subţiri pentru coloraţie.

Un frotiu subţire se prepară în felul următor : se ia o granulă riziformă sau un flocon mucos şi se aşază la una din extremităţile lamei. Această granulă se etalează pe întreaga lamă cu ajutorul unui tampon de vată, muiată în ser fiziologic, ţinut cu ajutorul unei pense de disecţie. O dată preparat, frotiul este colorat cu fucsină diluată 1/10 sau după metoda Gram.

Însămînţarea vărsăturilor şi materiilor fecale se face deosebit, după cum ele provin de la bolnavi în faza de atac holeric sau de la convalescenţi, purtători sau contacţi.

Vărsăturile şi materiile fecale provenite de la bolnavi în fază de atac holeric vor fi însămînţate direct în apa peptonată alcalină (mediul Schottelius, modificat de Koch), care va fi incubată la 37° numai 6—8 ore, după care timp se va însămînţa din vălul format pe acest mediu unul sau mai multe medii selective, solide.

Prepararea apei peptonate alcaline se efectuează astfel :

Peptonă *siccum Witte*	100 g
Clorură de sodiu	100 g
Nitrat de potasiu	1 g
Carbonat de sodiu cristalin	2 g
Apă distilată	1 000 ml

Se amestecă ingredientele în apa distilată caldă, se aduce la pH 8,6—9, se sterilizează şi se repartizează în flacoane. Această apă peptonată este soluţia mamă; pentru folosinţă se diluează o parte apă peptonată astfel preparată, la care se adaugă 9 părţi de apă sterilă, după care se repartizează în tuburi.

Iată formula unor medii selective solide:

Mediul Wilson şi Riley

Geloză 2% pH 8,8 topită şi răcită la 50°	100 ml
Soluţie de sulfit de sodiu 20%	4,8 ml
Licoare bismutică	0,16 ml
Alcool absolut	0,2 ml
Soluţie de manoză 10%	1,0 ml

Se amestecă şi se toarnă în plăci.

Licoarea bismutică se prepară în felul următor:

Se umple un flacon cu 500 ml apă distilată, se marchează nivelul superior şi se înlătură apa. Se introduc printr-o pîlnie 60 g citrat de bismut şi apoi 50 ml apă distilată. Se agită pînă ce citratul este transformat într-o pastă fluidă. Se adaugă apoi 20 ml amoniac 12, 5%. Amestecul este agitat cu o baghetă de sticlă; se produce o reacţie chimică cu degajare de căldură. Se agită flaconul şi cînd citratul de bismut este aproape dizolvat, se adaugă apă distilată pînă la nivelul 500 ml.

Mediul Ch'i şi Zia

Extract de carne	5 g
Peptonă	10 g
KNO_3	1 g
$Cl_2Mg(6H_2O)$	1 g
Clorură de sodiu	8 g
Apă distilată	900 ml
Agar	20 g

Amestecul se dizolvă la cald, se repune apa pierdută prin evaporare şi se ajustează pH 9,2. Se lasă să se limpezească, se înlătură sedimentul, se adaugă 100 ml soluţie de amidon 5%, care a fost în prealabil fiartă 2 minute, se distribuie în balonaşe de 100 ml şi se sterilizează la 110°, timp de 20 de minute. Imediat ce mediul s-a răcit la 60°, se adaugă la fiecare balonaş 1 ml de soluţie sterilă de telurit de potasiu 0,2% şi 1 ml de acid rozolic, soluţie 0,5% în etanol 90%. Se toarnă în plăci, după ce mai întîi a fost bine amestecat.

Mediul Aronson. La un litru de apă de robinet se adaugă 35 g agar. După o zi se mai adaugă extract de carne 10 g, peptonă 10 g şi clorură de sodiu 5 g, după care se fierbe 4—5 ore. Se lasă să se depună înclinat şi cînd sedimentul este complet depus se decantează supernatantul în baloane Erlenmayer de 250 ml. La 100 ml din acest agar încă fierbinte, se adaugă 6 ml de carbonat de sodiu *siccum*, soluţie 10%, după care se fierbe 15 minute. Se adaugă apoi:

Zaharoză soluţie 20%	5 ml
Dextrină soluţie 20%	5 ml
Fucsină diamant, soluţie alcalină saturată	0,4 ml
Sulfit de sodiu, soluţie 10% proaspătă	2 ml

Soluţiile de zaharoză, dextrină şi sulfit de sodiu se sterilizează separat prin fierbere 1/2 oră.

Din fiecare flacon de 100 ml mediu Aronson se prepară 2 plăci care se usucă la incubator. Mediul este transparent; păstrat la întuneric poate fi folosit mai multe zile.

Coloniile de vibrion holeric devin vizibile după o incubaţie de 10 ore, întîi incolore, iar după 15—20 de ore cresc ca volum şi devin de un roşu strălucitor. Coloniile de *Esch. coli* nu se dezvoltă în 15—20 de ore.

Mediul Dieudonné. Se prepară astfel : se ia o parte sînge defibrinat de bou, care se amestecă cu o parte soluţie normală de potasă caustică; soluţia alcalină de sînge lacat astfel obţinută, se sterilizează la vapori fluenţi.

Se iau 30 ml din soluţia de mai sus şi se adaugă la 70 ml agar, pH 7. Se toarnă în plăci Petri.

Plăcile astfel preparate se usucă timp de cîteva zile la 37° sau 5 minute la 60°, pentru evaporarea amoniacului din mediu, care inhibează creşterea vibrionului holeric. Mediul poate fi utilizat timp de 7 zile.

Alt mediu folosit este cel descris de Krumwide care substituie sîngele prin albuşul de ou : materiile fecale de la convalescenţi, purtători sau contacţi vor fi însămînţate mai întîi pe unul din mediile de îmbogăţire şi apoi se fac treceri pe unul din mediile selective solide.

Au fost descrise mai multe medii de îmbogăţire :

Mediul cu bilă de bou (Ottolenghi)

Bilă proaspătă de bou filtrată pe hîrtie de filtru	1 000 ml
Carbonat de sodiu cristalin	50 g
Nitrat de potasiu	1 g

Se distribuie cîte 5 ml în tuburi şi se sterilizează 20 de minute la 110°. Culturile de vibrion holeric apar mai pure decît în apa peptonată, însă ceva mai tîrziu.

Un mediu de îmbogăţire care, după majoritatea autorilor, a dat foarte bune rezultate, este *mediul Read*, care este o modificare a mediului Wilson-Blair, folosit pentru izolarea *S. typhi*. Formula şi pregătirea mediului sînt următoarele :

Soluţie de peptonă 2 %	8,8 ml
Amestecul de sare de mare	1,2 ml
Apă distilată sau suspensie de materii fecale în apă distilată	10,0 ml
Soluţie de manoză 10 %	1 ml
Licoare bismutică	0,12 ml
Soluţie de sulfit de sodiu 20 %	1,2 ml
Alcool absolut	0,2 ml
Perclorid mercuric ($HgCl_2$) 1 : 10 000	0,8 ml

Se aduce la pH 9 cu sodă caustică normală şi se adaugă albastru de bromtimol ca indicator.

Formula amestecului de „sare de mare" este următoarea :

Clorură de sodiu	27	părţi
Clorură de potasiu	1	parte
Clorură de magneziu	3	părţi
Sulfat de magneziu (7 H_2O)	1,75	părţi
Apă distilată	100,00	părţi

Formula licoarei bismutice este următoarea :

Citrat de bismut	60 g
Amoniac (12,5 %)	20 ml
Apă distilată	500 ml

Toate ingredientele mediului trebuie preparate în soluții separate. Soluția de peptonă și apă distilată este sterilizată în prealabil, însă numai cu puțin timp înaintea preparării mediului. Amestecul de „sare de mare", dacă este preparat cu apă sterilă, este utilizat ca atare. Manoza, în soluție 10 %, este preparată extemporaneu și sterilizată prin fierbere, în timp ce sulfitul de sodiu este supus la o temperatură suficientă care să-i permită dizolvarea.

Eficiența mediului lui Read este mult crescută față de a apei peptonate.

Se fac treceri pe unul sau mai multe medii de îmbogățire.

Cercetarea vibrionilor holerici în apă (procedeul Taylor și Ahuja, 1938) se efectuează în felul următor :

La 200 ml de apă suspectă se adaugă 20 ml soluție concentrată conținînd peptonă 10 % și ClNa 5 %. Se aduce la pH 9 prin adăugare de soluție N/1 de NaOH, în prezența de albastru de bromtimol ca indicator. După incubație, peste noapte, 2 ml din apa astfel tratată este însămînțată într-un tub cu 10 ml de apă peptonată și după o incubare de 6 ore se însămînțează pe unul din mediile selective solide și pe geloză 2 %.

Alt procedeu este următorul :

Se umple unul sau mai multe flacoane de un litru, cu apă de examinat, pînă la gîtul balonului. Apa este transformată într-un mediu de îmbogățire (Gohar) prin adăugare de :

Peptonă	1 %
Clorură de sodiu	0,5 %
Carbonat de sodiu	0,2 %
Taurocolat de sodiu	0,5 %
Telurit de potasiu	1/200 000

Se incubează la 37°. Se fac treceri pe medii selective solide la 8 și 24 de ore.

Se folosește cu rezultate bune și procedeul următor :

Se filtrează cîțiva litri de apă prin filtrul Seitz. Se scoate filtrul și se introduce în totalitate în apă peptonată sau în mediul Read. Se incubează peste noapte și se fac treceri pe medii selective solide.

Identificarea vibrionilor holerici crescuți pe mediile selective solide și pe geloză 2 % se face în felul următor : coloniile izolate, caracteristice, sînt aglutinate în prezența serurilor aglutinante antiholerice „O" Inaba și Ogawa, fie amestecate, fie separate, în diluție 1/50–1/100. Coloniile care conțin vibrioni aglutinabili pe lamă sînt trecute pe geloză 2 % în vederea aglutinării în tub. În acest scop se folosește ser fiziologic formolat 2‰ suspensia finală de vibrioni avînd o densitate de 2 miliarde pe ml. Temperatura de incubare 52°. Aglutinarea se citește la 2 ore și definitiv la 20 de ore. Vibrionii holerici autentici trebuie să aglutineze 50–75 % din titrul serului aglutinant folosit.

Cercetarea *hemolizei* vibrionilor se execută astfel : o cultură pe geloză 2 % de virioni holerici se aduce la o densitate de 8 miliarde pe ml ;

1 ml din această suspensie, pus în contact cu 1 ml suspensie 3% de eritrocite de capră spălate, se menţine 2 ore la 37° şi la gheţar peste noapte. Se citeşte fenomenul de liză a doua zi.

Pentru primele cazuri de boală este util să se practice, atît fenomenul Pfeiffer-Isaeff, cît şi activitatea fermentativă după schema Heiberg.

Fenomenul Pfeiffer-Isaeff (vibrioliza) se obţine fie *in vitro*, fie *in vivo*.

In vitro se procedează în felul următor: serul antiholeric Inaba sau Ogawa se diluează 1/50; 1/100; 1/200; 1/500; se foloseşte în reacţie 1 ml din fiecare diluţie. Se adaugă apoi 0,25 ml alexină de cobai, diluată 1/10 şi o picătură sau 0,05 ml dintr-un tub de cultură pe geloză înclinată, suspensionată în 5 ml ser fiziologic. Se folosesc mai mulţi martori: martor pentru ser aglutinant (fără alexină); martor pentru alexină (fără ser aglutinant); martor pentru cultură (fără ser aglutinant şi fără alexină).

În tabelul LIV se dă schema reacţiei.

Tabelul LIV

Fenomenul de vibrioliză *in vitro*

Ingrediente	Ser aglutinant				Martor		
	1/50	1/100	1/200	1/500	Ser	Alexină	Cultură
Ser antiholeric	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	—	1 ml 1/50	—
Alexină 1/10	0,25 ml	0,25 ml	0,25 ml	0,25 ml	0,25 ml	—	—
Suspensie de vibrioni	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
Ser fiziologic	—	—	—	—	1 ml	0,25 ml	1,25 ml

Se incubează 2—3 ore la 37°; după o oră, eventual după 2 sau 3 ore, se fac frotiuri, se colorează cu fucsină diluată 1/10 şi se examinează aglutinarea, transformarea granulară şi liza.

In vivo, vibrioliza se practică după cum avem la îndemînă cobai vaccinaţi antiholeric sau cobai nevaccinaţi contra acestei infecţii.

a) În primul caz, un cobai care să nu depăşească 200 g în greutate, puternic imunizat mai înainte, cu vaccin antiholeric, primeşte în peritoneu 1 ml de apă peptonată în care s-a diluat o ansă dintr-o cultură de 18 ore de vibrioni pe geloză. Se inoculează concomitent şi un cobai martor nevaccinat. Începînd de la 1/4 oră, 1/2 oră, 3/4 oră şi nu mai tîrziu de o oră se scot cu ajutorul unei pipete Pasteur atît de la cobaiul vaccinat, cît şi de la cel nevaccinat cîteva picături din exsudatul peritoneal, cu care se efectuează frotiuri. La cobaiul vaccinat, în caz de vibrioliză, se constată fie transformarea vibrionilor în granule, fie liza completă; la cobaiul nevaccinat, vibrionii îşi păstrează morfologia lor clasică.

b) În cazul cobailor nevaccinaţi se procedează în felul următor: cobai în greutate de 250 g, primesc în peritoneu o ansă dintr-o cultură de vibrioni suspensionată într-un ml ser aglutinant antiholeric. Titrul aglutinant al serului trebuie să fie ridicat (cel puţin 1/500). Urmărirea fenomenului de vibrioliză se face ca mai sus.

Activitatea fermentativă în raport cu schema Heiberg se efectuează în felul următor: se folosesc soluţii de zaharoză, manoză şi arabinoză 5%, sterilizate prin fierbere, care se adaugă la apă peptonată în proporție de 1/10; concentrație finală 0,5%. Se adaugă indicator albastru de bromtimol.

Epidemiologie

Holera este o boală epidemică, sezonieră (limitată la lunile de vară), toxică, cu mare putere de răspîndire. Un singur bolnav poate provoca o epidemie care, de obicei, se instalează brusc. Holera a cunoscut 6 pandemii între anii 1817 și 1897. Cu toate măsurile luate, datorită ușurinței și rapidității actualelor mijloace de locomoție, pericolul difuziunii holerei rămîne potențial, ca probă epidemia care a avut loc în Egipt în 1947.

Focare endemice se întîlnesc în India, Japonia, Indonezia etc., de unde pornesc valuri epidemice. Tulpina de vibrion holeric Inaba este mai frecventă în Japonia, Ogawa în unele părți ale Indiei, iar tulpina Hykojima în China, vibrionii holerici hemolitici în regiunile El Tor și Celebes.

Sursa de infecție este constituită de omul bolnav și de purtătorul în incubație. Purtătorii convalescenți și contacții par să fie mai puțin periculoși (Nicholls).

Persistența vibrionilor holerici în scaunele convalescenților este relativ restrînsă, putînd fi izolați numai la 1,5% după 3 săptămîni de boală și niciodată după 2 luni (Jing, 1940, și observațiile din Egipt, 1947).

Căile de transmitere sînt reprezentate prin apă (de băut, de rîu etc.) care constituie calea cea mai de temut; pe alimente vibrionul trăiește, în medie, două zile, pe rufărie și îmbrăcăminte nu trăiește mai mult de 4 zile.

Starea de imunitate a populației joacă un rol important. Profilaxia prin vaccinare poate să ajute la stingerea epidemiei (Cantacuzino). Cu un vaccin omorît, bogat în germeni (8 miliarde/ml), vaccinarea este efectuată prin două inoculări la interval de o săptămînă. Dacă din motive epidemiologice se practică un „rappel", acesta va fi făcut în maximum 6 luni de la vaccinare; dacă au trecut 6 luni de la vaccinarea anterioară, se vor practica două inoculări de vaccin, la fel ca la o vaccinare nouă.

Măsurile generale de profilaxie, luate cu ocazia epidemiei de holeră din Egipt din 1947, s-au referit și la:

— izolarea precoce a bolnavilor, supravegherea suspecților și dezinfecția locuințelor lor;

— izolarea contacților și eliberarea lor numai după două examene negative, consecutive;

— controlul bacteriologic și sanitar al apei de băut și controlul sanitar al alimentelor;

— clorinarea apei de băut, provenită din rîuri situate în zonele epidemice;

— închiderea ștrandurilor și interzicerea spălatului rufelor în rîuri;

— închiderea restaurantelor, piețelor publice, fabricilor de gheață și ape gazoase;

— distrugerea gunoaielor menajere și dezmuștizarea riguroasă;

— înhumarea cadavrelor fără procesiuni religioase;

— vaccinarea specifică a întregii populații în timpul cel mai scurt.

Genul (grupul) Pseudomonas

Dr. T. Meitert

Specia tip: *Pseudomonas aeruginosa*

Sinonime: *Pseudomonas pyocyanea, Bacillus pyocyaneus, Bacterium pyocyaneum*, bacilul piocianic.

Definiție: bacili în general mobili (cu cili polari mono- sau lofotrichi), gram-negativi, nesporulați, necapsulați, în general aerobi (anumite specii sînt facultativ anaerobe), majoritatea producînd pigmenți difuzibili de diferite culori (albastru, galben-verde fluorescent, violet, roșu, galben etc.). Uneori pigmentul de culoare roșie sau galbenă este nedifuzibil.

Istoric. În 1882, Gessard izolează, dintr-un puroi albastru, o bacterie mobilă care elabora un pigment albastru, piocianina, și un pigment galben-verde fluorescent, fluoresceina.

Habitat. Foarte răspîndit în natură (sol, aer, apă) și pe tegumente (mai ales în regiunea axilară și perineală), în cavitățile naturale și în tubul digestiv al omului și al animalelor.

Caractere morfologice: Bacili subțiri, inegali ca lungime, deseori filamentoși, uneori, mai ales pe medii cu antiseptice (fenol, naftol, acid boric, cromat de potasiu, creozot), cu forme de involuție în virgulă, filamente ondulate sau chiar coci în lanțuri scurte etc. Este foarte mobil, prezentînd unul sau mai mulți cili polari de obicei la un singur cap, uneori la ambele. Există și variante imobile. Nesporulat, necapsulat, gram-negativ. Se colorează ușor cu coloranți de anilină. Formele bătrîne apar granulate.

Caractere de cultură: B. piocianic crește ușor pe mediile obișnuite, elaborînd pigment solubil în apă și difuzibil în mediul de cultură. Este în general aerob, dezvoltîndu-se greu în anaerobioză. Temperatura de creștere 5–42° (optimum 37°), pH variază între 5,6 și 8 (optimum = 7,2).

În *bulion simplu* sau *apă peptonată* se observă o tulburare după cîteva ore, formîndu-se la suprafață o peliculă cenușie, aderentă de pereții tubului. După cîteva zile, vălul se îngroașă, se pliază, se fragmentează și cade la fund sub formă de depozit gleros. Mediul devine filant și vîscos. Colorația albastru-verde apare după 24 de ore. După 3–4 zile se remarcă un miros fad, aromatic, comparabil cu cel al florilor de accacia (datorit producerii de trimetilamină).

Pe geloză dă colonii rotunde, convexe, fluorescente, deseori cu reflex metalic, de culoare galben-verzuie în culturile tinere (după cîteva zile pigmentul devine roşu-brun). După menţinerea cîteva zile la 25—30°, populaţia microbiană se disociază, dînd colonii de tip „S”, colonii „R” şi cîteodată colonii „M”, vîscoase, amorfe (Sonnenschein găseşte forme mucoase apărute sub acţiunea fagului şi care redevin nemucoase sub acţiunea bilei). Alţi autori (Gaby) au deosebit 3 tipuri de colonii: şi anume: colonii „A”, netede plate, producînd pigment verde fluorescent; colonii „B” granulare, cu margini dinţate, elaborînd piocianină şi colonii „C”, neregulate, ombilicate, cu margini lobate. Aceste tipuri de colonii sînt instabile după cîteva treceri pe medii cu glicerină.

Deseori se observă culturi lizogene prezentînd plaje în cultura pe geloză, datorită bacteriofagului. Se mai pot observa aşa-numitele pseudoplaje, cu reflex metalic argintiu inhibate de săruri biliare, streptomicină şi alţi agenţi.

In geloza Veillon, coloniile zonei de anaerobioză, sînt rotunde sau lenticulare, cu margine regulată, avînd 1—2 mm diametru. Pigmenţii albastru şi verde-fluorescent nu sînt elaboraţi decît în zona de aerobioză.

Pe cartof creşte abundent, sub forma unui depozit brun. Piocianina şi pigmentul verde-fluorescent năpădesc cartoful, care devine cenuşiu şi apoi negricios (prin oxidarea tirozinei).

Pe ser coagulat, suprafaţa mediului devine neregulată după 48 de ore, găurită de anfractuozităţi, de unde se scurge un lichid către fundul tubului. Mediul se pigmentează foarte rapid.

Pe albuş de ou coagulat, suprafaţa mediului devine anfractuoasă după 5—6 zile şi microbul nu elaborează decît un pigment verde fluorescent.

Caractere biochimice şi de metabolism. Pseudomonadele constituie un grup de germeni de trecere de la autotrofi la heterotrofi.

Ps. aeruginosa prezintă următoarele caractere: fermentează fără producere de gaz arabinoza şi xiloza. Glucoza este oxidată în acid gluconic, acid 2-cetogluconic şi alţi produşi intermediari. Nu fermentează maltoza şi zaharoza, lactoza, fructoza, galactoza, inulina, dulcita, glicerolul şi amidonul.

Reacţiile Voges-Proskauer şi roşu de metil sînt negative. Reduce nitraţii în nitriţi şi în azot gazos. Nu produce H_2S şi NH_3, reduce albastrul de metilen.

Creşte în mediu cu citrat ca unică sursă de carbon. Reacţia catalazei este pozitivă, iar reacţia indolului negativă. Coagulează laptele după 3—4 zile şi digeră lent cheagul. Lichefiază gelatina mai întîi în formă de pîlnie şi apoi de cilindru. Rapiditatea şi intensitatea lichefierii variază după tulpină.

Secretă o hemolizină (piocianolizina), termostabilă, faţă de hematiile mamiferelor (cîine, cal, cobai, iepure etc.), şi care pe mediu geloză-sînge produce o hemoliză de tip β. B. piocianic elaborează o serie de pigmenţi care joacă rol în respiraţia bacteriei. Astfel au fost descrişi:

1. *Piocianina:* pigment albastru, caracteristic pentru specie căreia îi aparţine exclusiv. Deseori este mascat de pigmentul verde fluorescent. În acest caz se pune în evidenţă prin adăugare de cloroform, pe care piocianina îl colorează în albastru. Poate elibera piocianina în medii sintetice care conţin ca sursă de azot: asparagina, sulfatul sau clorura de

amoniu şi tirozina. Ionii de Mg, SO_4, K, PO_4 şi Fe sînt esenţiali pentru formarea de piocianină.

Piocianina este un derivat al fenazinei, pe care *Pseudomonas aeruginosa* îl sintetizează plecînd de la substanţe simple : acid lactic şi săruri. Formula sa este $C_{12}H_{24}N_4O_2$ (Wrede). Este solubilă în apă caldă, nitrobenzen, fenol, piridină şi cloroform. În soluţii acide se colorează în roşu, iar în soluţii alcaline în albastru. Pentru a o obţine în stare cristalizată, se evaporă la etuvă o soluţie cloroformică de piocianină : cristalele albastre apar sub formă de lamele sau de ace orientate în stea (Fordos, 1915). Piocianina în soluţie cloroformică, expusă la lumină şi oxidată prin clorul pe care îl degajează cloroformul, se transformă în pioxantoză. Sub acţiunea unei soluţii acide de acid sulfuric 33% această substanţă virează în roşu. Formarea piocianinei este inhibată de KNO_3 5%, $KClO_3$ 8%, tartrat de amoniu 0,5%, NaCl 5% sau dezinfectanţi care nu omoară germenul.

2. *Pigmentul galben-verde fluorescent*: este elaborat în mediu constituit din albuş de ou coagulat, dar cel mai des este asociat cu piocianina în mediile uzuale de cultură. În mediu sintetic, conţinînd nitraţi ca sursă de azot, b. piocianic nu produce decît acest pigment. Turfitt a obţinut o eluare a pigmentului verde fluorescent în fenol şi acid acetic, urmată apoi de filtrare prin cărbune de lemn. După concentrarea lichidului, obţine o pudră brună, solubilă în apă, fenol, acid acetic şi insolubilă în alţi solvenţi. Soluţia alcalină diluată este verde-fluorescentă, în timp ce soluţia acidă este incoloră, nefluorescentă. Jordan a arătat că pentru formarea acestui pigment sînt necesari sulfaţi şi fosfaţi; aceste substanţe nu sînt necesare pentru formarea de piocianină. Deseori culturile vechi ale varietăţilor fluorescente de *Pseudomonas aeruginosa* prind o tentă brună-roşie, datorită oxidării pigmentului verde, care se transformă într-o materie colorantă, piorubrina (Turfitt).

3. *Pigmentul melanogen.* Unele varietăţi de *Pseudomonas* elaborează în mediu un pigment care devine negru închis (*Pseudomonas melanogenes*).

4. *Pigmentul eritrogen* este elaborat de anumite varietăţi de b. piocianic. Este galben-închis, apoi devine roşu prin oxidare.

Pe baza proprietăţii de a produce unul sau mai mulţi dintre aceşti pigmenţi, s-a reuşit să se pună în evidenţă mai multe rase de bacili piocianici mai mult sau mai puţin stabile.

Astfel, Gessard a stabilit că varianta PeA, dacă este cultivată în bulion, elaborează, atît piocianină, cît şi pigment galben-verde fluorescent; dacă este cultivată însă pe un mediu constituit din albuş de ou lichid, produce în acest mediu numai pigment galben-verde fluorescent. Dacă după un an de cultivare în acest mediu se repică din nou în bulion, tulpina produce numai piocianină (rasa P). Varianta PeA, încălzită la 57°, elaborează în bulion numai pigment galben-verde fluorescent, fără a mai produce piocianină (rasa F). Se poate dobîndi şi o rasă acromogenă (rasa O), care se obţine însămînţînd în bulion rasa P, încălzită 5 minute la 57°. Varietăţile eritrogene produc în aceleaşi condiţii, rasele P, F şi O.

Pentru punerea în evidenţă a diverselor rase şi varietăţi pigmentogene de *Pseudomonas*, Gessard a recomandat cultivarea pe un mediu care permite elaborarea piocianinei la tulpinile care au pierdut această proprietate. Mediul conţine apă peptonată cu 10% glicerină şi suficient agar pentru solidificare. Există şi variante care nu mai elaborează piocianină în mediile glicerinate, dar secretă pigmentul galben-verde fluorescent în bulion, fiind greu de deosebit de *Pseudomonas fluorescens.*

După Cataliotti (1935), cultivarea tipurilor de *Pseudomonas* în bulion cu 2% oxid de zinc sau 1% sulfat de zinc suprimă pigmentul după cîteva treceri (retrecute pe mediu obişnuit produc din nou pigment).

Pigmentogeneza este favorizată de aeriobioză, fiind însoţită de o atenuare a activităţii fermenţilor tripsici (de pildă, în plăgi superficiale), concomitent cu o scădere a potenţialului de oxidoreducere a mediului. În anaerobioză, facultatea de a produce pigment dispare; în schimb, se exacerbează activitatea triptică (ceea ce explică de ce, în anumite condiţii, în organism posedă acţiune necrozantă). Capacitatea cromogenă mai poate fi abolită şi prin treceri succesive în medii acide.

Printre produsele de metabolism ale b. piocianic se numără şi *piocinaza* (Emmerich şi Löw, 1899) care, deşi prezintă terminaţia în „ază", nu este totuşi considerată de unii autori ca o enzimă. Piocinaza este termostabilă. În ultimii ani Schoental a extras mai multe substanţe răspunzătoare de activitatea antibacteriană a tulpinilor de *Pseudomonas* : piocianina, α-oxifenazina şi substanţe bacteriolitice pentru vibrionul holeric. α-oxifenazina inhibează cocii gram-pozitivi în diluţie de 1/20 000 şi *B. proteus*, *Brucella melitensis*, *Neisseria gonnorrhoeae* şi *Neisseria intracellularis* în diluţie de 1/10 000. Derkoch a obţinut o piocianină sintetică, puţin toxică, cu capacitate bacteriostatică faţă de *Brucella*, *Vibrio comma*, *Schigellae*, *Corynebacterium dyphtheriae*, *Haemophilus pertussis*, *B. antrhacis*. Din corpii microbieni trataţi cu alcool, centrifugaţi şi apoi emulsionaţi într-o soluţie de bicarbonat de sodiu, Hays şi colaboratorii au extras 4 substanţe care diferă după greutatea lor moleculară, punctul de fuziune şi spectrul de absorţie în ultraviolet. Fracţiunea cea mai activă, Pyo II, posedă o putere bacteriostatică foarte ridicată pentru microbii mai sus enumeraţi.

Jacob (1954) arată că în bacilul piocianic se mai poate găsi şi o altă substanţă, piocina, analogă colicinelor, şi care s-a dovedit activă asupra altor tulpini de bacili piocianici. Piocina este diferită de piocianină şi compuşii „pio". Numeroase analogii au fost semnalate între piocine şi bacteriofagi, atît prin modul lor de producere, cît şi prin modul lor de acţiune.

Rezistenţa la agenţi fizici, chimici şi biologici. B. piocianic este distrus de căldură în 15 minute, la 60° (sau în 30 de minute la 58°, sau într-o oră la 55°). Se poate înmulţi chiar şi la + 4°.

Atît *Ps. aeruginosa*, cît şi *Ps. fluorescens* sînt mai rezistenţi decît alte organisme vegetative la acţiunea razelor ultraviolete (Burge şi Neill, 1915). Se pare că aceşti germeni sînt capabili să transforme razele cu lungime de undă scurtă în raze cu lungime de undă lungă şi să folosească diferenţa de energie.

B. piocianic trăieşte cîteva luni în bulion sau pe geloză, la temperatura camerei. În bulion cu gelatină se conservă la gheaţă timp de cel puţin 8 ani. Este distrus de majoritatea antisepticelor uzuale.

Dintre chimioterapicele şi antibioticele cunoscute, este în general sensibil numai faţă de colimicină, neomicină şi polimixina B. Lightborn a putut obţine din *Ps. aeruginosa* o substanţă care distruge activitatea streptomicinei şi a dihidrostreptomicinei.

Tulpinile de bacili piocianici pot fi sensibile faţă de un bacteriofag specific. Se obţin foarte greu fagi cu acţiune polivalentă, spectrul de acţiune al acestora fiind în general limitat. De asemenea antrenarea fagilor pe tulpini mai mult sau mai puţin sensibile reuşeşte destul de greu. Procentul tulpinilor lizogene este foarte mare. În funcţie de metodă şi de numărul tulpinilor indicatoare utilizate, tulpinilor de *Pseudomonas* li se pot pune în evidenţă lizogenia în proporţie de 89% (Meitert şi Meitert).

Structura antigenică. Deşi au fost întreprinse numeroase cercetări, structura antigenică a bacililor piocianici nu este încă elucidată, rezultatele cercetărilor fiind deseori contradictorii.

În 1926, Aoki stabileşte 22 de tipuri antigenice printre 50 de tulpini cercetate; Kanzaki (1934), 34 tipuri din 102 tulpini etc. În 1948, Cristie, folosind metoda precipitării, împarte 138 de tulpini în 13 grupe serologice, iar Van de Ende (1952) 24 de tulpini în 6 grupe serologice.

Boivin şi L. Mesrobeanu (1937), folosind tehnica extragerii cu acid tricloracetic, izolează din *Ps. aeruginosa* un complex glucido-lipidic conţinînd un polizaharid cu caracter de haptenă, avînd proprietăţile generale ale endotoxinelor izolate de la germenii din grupul *Salmonella.*

Spre deosebire de alţi autori (Munoz, Scherego, Deaver, 1949), Mayr-Harting, în 1948, pune în evidenţă heterogenitatea antigenică a tulpinilor de *Pseudomonas*, deosebind foarte greu antigenele flagelare de cele somatice.

Köhler (1957), folosind metoda precipitării cu formamidă (metoda Fuller), reuşeşte să clasifice 70% din 383 de tulpini studiate în 8 grupe serologice. În acelaşi an, Habs, pe baza antigenelor „O", stabileşte 12 grupe serologice din 70 de tulpini studiate.

Kleinmayer, Scheiner şi Gräff (1958) arată că la *Ps. aeruginosa* există, alături de fracţiuni antigene „O" termostabile, şi antigene termolabile. Două tulpini pot avea acelaşi antigen „O" şi antigene termolabile diferite, şi invers. Identificarea tulpinilor ar fi posibilă numai pe baza antigenelor labile. În U.R.S.S., Cernomordik (1956) diferenţiază 10 tipuri serologice (din 160 de tulpini studiate) pe baza antigenelor flagelare, arătînd că fracţiunea „O" joacă un rol secundar în fenomenul de aglutinare.

T. Meitert şi E. Meitert au diferenţiat pe baza antigenelor termolabile un număr de tipuri serologice, iar pe baza antigenelor termostabile 10 grupe serologice distincte (I–X). Aceiaşi autori au remarcat frecvenţa ridicată a grupului serologic II (51% din tulpinile izolate din diferite produse patologice).

Trebuie semnalat, în sfîrşit, şi faptul că s-au descris înrudiri antigenice ale *Ps. aeruginosa* cu bacilul morvei, cu bacili dizenterici etc.

Caractere de patogenitate. La iepure, inoculînd 1–3 ml de cultură în bulion, se produce o leziune inflamatoare locală, însoţită de necroză. Animalul slăbeşte, membrele posterioare paralizează, scaunele devin diareice, după care urmează moartea. La necropsie se constată o infiltraţie foarte întinsă la locul de inoculare, ficatul şi rinichii congestionaţi, splina fiind normală; 1 ml pe cale intravenoasă determină moartea în 48 de ore, cu leziuni minime: congestia rinichilor şi a intestinului subţire. O cantitate mai mică de cultură (0,25 ml) produce o slăbire progresivă şi moartea după 15—20 de zile, cu leziuni de nefrită scleroasă și abcese multiple ale rinichiului. Germenul se găsește în puroi, însă niciodată nu poate fi pus în evidență în frotiuri de organe sau sînge. Se poate însă izola din puroi și sînge, viscere și urină. Leziunile care se observă pot apărea și după inocularea de culturi omorîte, endotoxina fiind probabil răspunzătoare de apariția lor.

La cobai, 0,5 ml de cultură introdus pe cale intraperitoneală produce la cobaiul mascul o vaginalită supurată. Pielea burselor devine roșie, țesutul celular se edemațiază și testiculele fixate în burse nu pot să reintre în peritoneu. Unele animale slăbesc și sucombă, altele se vindecă, puroiul eliminîndu-se prin fistulă cutanată. Inocularea pe cale subcutanată determină leziuni necrotice. Se pot observa și necroze osoase. La cobai se mai poate izola din infecții spontane o specie capsulată, patogenă pentru șoarece și nepatogenă pentru iepure (*Ps. caviae*).

La șoarece, după inoculare subcutanată se produce septicemie și moarte.

Există și tulpini avirulente, care nu omoară animalele.

La pești (somon, lostriță), *Ps. salmonicida* produce o boală supurativă, iar în crescătoriile de somni și păstrăvi *Ps. punctata* determină epidemii omorîtoare.

La om, *Pseudomonas* se întîlnește în plăgi supurate, leziuni necrotice cutanate (ectima gangrenoasă), arsuri suprainfectate, leziuni ombilicale ale nou-născuților, otite (uneori cu leziuni necrotice ale oscioarelor, mai ales la copii), mastoidită, diaree, în special la copii, uneori în legătură cu existența unei mamite cronice enzootice cu *Ps. aeruginosa* la vaci (Jarbert și Valentin, 1957), meningite, pleurezii, infecții pulmonare, angiocolite, leziuni ulceroase ale mucoaselor tubului digestiv, endocardite, bacteriemii, septicopiemii, septicemii (acestea din urmă sînt grave și se însoțesc de flictene cutanate). Puroiul care conține B. piocianic este de culoare verde-albastră și posedă un miros particular. Deseori, cînd B. piocianic este în stare pură, puroiul are o nuanță galbenă ca aurul sau, în cazul în care există condiții de anaerobioză (supurația urechii interne), poate fi incolor.

La adulți, *Pseudomonas* mai poate fi întîlnit deseori în fistule de osteită, infecții urinare (cistite, pielonferite), pleurezii purulente consecutive pneumotoraxului, în infecții oculare (conjunctivite, keratite) și infecții articulare. Deseori se asociază cu anemie și fenomene de nefrită, favorizate de toxinele microbiene care s-ar resorbi.

După Pons, *Pseudomonas aeruginosa* ar fi deosebit de patogen la tropice, unde determină infecții cu aspect tific, precum și abcese ale ficatului.

Imunitate. Cercetînd prezența anticorpilor antipiocianici în serul bolnavilor cu arsuri suprainfectate cu B. piocianici. Fox și Lowbury (1953) constată titruri cu atît mai mari, cu cît infecția este mai veche și arsurile mai întinse. Prezența aglutininelor nu indică însă un rol protector, ci doar prezența infecției. La normali, ca și la bolnavi cu arsuri neinfectate, titrul aglutinant al anticorpilor este mic.

Tratament. Dintre antiseptice, se utilizează mai ales acidul boric 1%, în special în tratamentul plăgilor supurate. De asemenea, s-au mai utilizat acidul acetic și acidul mandelic. Dintre chimioterapice și antibiotice dau rezultate bune în special colimicina, neomicina şi polimixina B. În infecţiile cu *Pseudomonas pyocyanea* se obţin uneori rezultate bune prin folosirea bacteriofagului specific adaptat pe tulpina respectivă. La noi în ţară, E. Meitert şi T. Meitert au preparat bacteriofagi terapeutici care au dus la vindecarea unor infecţii localizate şi au permis în unele infecţii urinare cu B. piocianici, ameliorări ale stării clinice, observîndu-se uneori şi modificări ale spectrului de sensibilitate faţă de antibiotice (constînd în apariţia sensibilităţii faţă de unele antibiotice) sub influenţa bacteriofagului terapeutic administrat (M. Ciucă şi colaboratorii).

Trebuie amintit că în preparatele γ-globulinice de om, Rozenthal, Millican şi Rust semnalează, în 1957, un factor activ faţă de infecţiile cu *Pseudomonas aeruginosa*.

Diagnosticul de laborator

Diagnosticul bacteriologic se efectuează prin însămînţarea prin dispersie pe mediile uzuale (geloză) a produsului patologic (diluat convenabil în ser fiziologic). Se poate efectua izolarea şi pe mediile Drigalski (colonii lactozo-negative) sau pe mediul cu bilă uscată Istrati-Meitert (colonii albastru închis, foarte aderente de mediu).

S-a mai recomandat ca mediu selectiv şi geloza cu pH 7,8, la care se încorporează 0,1% Cetrimide (bromură de cetiltrimetilamoniu, Lowbury, 1951). De asemenea, Habs şi Kirschner (1943) propun un mediu de îmbogăţire cu glucoză şi verde malahit 1/100 000.

Pentru identificare se trece la cercetarea caracterelor morfologice, biochimice şi de metabolism, dintre care cele mai însemnate sînt : pigmentogeneza, mirosul caracteristic de trimetilamină, creşterea la 41—42°, capacitatea de a oxida gluconatul de potasiu în cultura agitată, lichefierea gelatinei, patogenitatea pentru animalele de laborator şi, eventual, sensibilitatea faţă de fagul specific. De asemenea, foarte utilă pentru precizarea diagnosticului bacteriologic s-a dovedit a fi şi reacţia citocromoxidazei (Kowacs şi Hadley), în special pentru recunoaşterea rapidă a variantelor acromogene. Tehnica folosită este următoarea : la 4—5 ml cultură în bulion se adaugă 0,2 ml α-naftol, soluţie alcoolică 1% şi 0,3 ml paraaminodimetilanilinoxalat, soluţie apoasă 1%. După agitare puternică şi după 15—30 de secunde de la adăugarea reactivilor, în cazul unei reacţii pozitive apare o culoare albastră, ceea ce indică prezenţa citocromoxidazei în celula bacteriană. Se poate efectua reacţia şi în plăci, amestecînd părţi egale din reactivii de mai sus şi picurînd cîteva picături peste cultura pe geloză (sau peste coloniile izolate). Pe medii obişnuite (geloză 2% şi geloză-sînge), coloniile devin albastre după 15—30 de secunde. Reacţiile pozitive care apar peste 1 minut de la adăugarea reactivilor nu se iau în considerare. Trebuie să se ţină seama, de asemenea, că reacţii pozitive apar şi cu *B. fecalis alcaligenes*.

Diagnosticul diferenţial pentru *Pseudomonas aeruginosa* se face în special cu *Pseudomonas fluorescens*, aceasta din urmă fiind considerată de mulţi ca o varietate saprofită a speciei *Pseudomonas aeruginosa*. Diferenţele arătate mai jos (în parte după Topley şi Wilson) nu sînt constante.

Ps. aeruginosa	*Ps. fluorescens*
elaborează piocianină și pigment galben-verde fluorescent ;	elaborează numai pigment galben-verde fluorescent ;
temperatura de creștere între 0 și 42° ; optim la 37° ;	temperatura de creștere între 0 și 37° ; optim la 25° (nu crește la 42°) ;
lichefiază gelatina ;	lichefiază inconstant gelatina ;
patogen pentru iepure și cobai	nepatogen pentru iepure și cobai

Prin cultivare în laborator, multe tulpini își slăbesc proprietatea de a forma pigment. Prin dispersie se pot obține colonii verzi-albăstrui și colonii galbene (care conțin numai pigment galben-verde fluorescent). Bonjean, pe de o parte, și Combiescu și Magheru, pe de alta, arată că se poate obține capacitatea de a produce piocianină prin treceri în peritoneul cobaiului. Pentru a deosebi variantele de *Pseudomonas aeruginosa* care au pierdut facultatea de a elabora piocianină și care eliberează numai pigment verde fluorescent, de *Pseudomonas fluorescens*, Lounoy recomandă să se cerceteze reacția de precipitare cu un ser preparat cu o proteină extrasă din *Ps. aeruginosa*. În prezența acestui ser, germenul respectiv nu lichefiază gelatina, în timp ce *Ps. fluorescens* lichefiază.

King și Roney (1954) propun următoarele medii pentru demonstrarea piocianinei și a pigmentului galben-verde fluorescent (fluoresceină).

Pentru *piocianină* :	bactopeptonă	20 g
	bactoagar	15 g
	glicerol C.P.	10 g
	SO_4K_2 (anhidru)	10 g
	Cl_2Mg (anhidru)	1,40 g
	Apă de robinet	1 000 ml
	pH = 7,2	
Pentru *fluoresceină* :	proteose-peptonă nr. 3	20 g
	bactoagar	15 g
	glicerol C.P.	10 g
	PO_4HK_2 (anhidru)	1,5 g
	SO_4Mg cu $7H_2O$	1,5 g
	Apă de robinet	1 000 ml
	pH = 7,2	

Epidemiologie. *Pseudomonas pyocyanea* produce deseori infecții intraspitalicești, în special în serviciile de chirurgie și urologie.

Analiza infecțiilor produse de *Ps. pyocyanea* arată că acestea au devenit din ce în ce mai frecvente, iar formele clinice din ce în ce mai severe. Diferiți autori notează, printre altele, creșterea accentuată a cazurilor de septicemie piocianică și se insistă din ce în ce mai mult asupra creșterii rolului patogen al acestei specii microbiene.

Recent, Graber și colaboratorii insistă asupra necesității unor cercetări ample în această problemă „mai înainte ca *Ps. pyocyanea* să-și asume rolul pe care stafilococul l-a jucat în ultima decadă".

Dintre cauzele care stau la baza înmulțirii și agravării cazurilor de infecții cu *Ps. pyocyanea*, trebuie semnalată în primul rînd folosirea din ce în ce mai frecventă a antibioticoterapiei, precum și înmulțirea manevrelor de explorare și intervenție medicală care deseori produc microtraumatisme, constituind astfel poarta de intrare a acestor germeni în organism.

Corynebacterium dyphtheriae şi toxiinfecţia difterică

Dr. T. Ieremia, dr. Paula Maximescu

Familia: *Corynebacteriaceae*. Genul: *Corynebacterium*. Specia, tip: *Corynebacterium dyphtheriae* (Lehman şi Neumann, 1896).

Definiţie. Corinebacteriile sînt bacili scurţi sau lungi, pleomorfi, uneori cu extremităţile umflate în formă de măciucă (*coryne*=măciucă), imobili, nesporulaţi, lipsiţi de capsulă, gram-pozitivi, cu o structură internă heterogenă, aşezaţi caracteristic în palisade sau grămezi.

Sînt microbi care se dezvoltă obişnuit aerob şi microaerofil, dar unele specii pot fi strict anaerobe.

Specia patogenă pentru om, *Corynebacterium dyphtheriae*, secretă o exotoxină difuzibilă, care provoacă la om simptomatologia caracteristică toxiinfecţiei difterice.

Din acest grup de bacterii larg răspîndite în natură, mai fac parte cîteva specii patogene pentru animale: *C. acnes*, *C. ovis*, *C. equi*, *C. renale*, *C. murisepticum*, *C. pyogenes*, *C. pseudotuberculosis* şi specii nepatogene adaptate la un parazitism comensal în organismul uman. Aceste specii nepatogene, reprezentate de: *C. xerosis*, izolată de Lehman şi Neumann (1896) din secreţia conjunctivală; *C. pseudodyphtheriticum hoffmanni* (1888); *C. hoagi* (Eberson, 1918); *C. paradyphthericum* (Lubinski, 1921); *C. cutis commune* (Wellenhof, 1888), se întîlnesc frecvent în rinofaringele omului. Datorită asemănării morfologice cu bacilul difteric aceşti germeni au fost denumiţi bacili „difterimorfi", creînd dificultăţi în diagnosticul bacteriologic al difteriei.

Istoric. Toxiinfecţia difterică, deşi cunoscută din antichitate, a fost multă vreme confundată cu alte afecţiuni ale faringelui.

Abia în secolul al XIX-lea, clinicianul francez Brettoneau a individualizat afecţiunea din punct de vedere clinic şi i-a dat numele de difterită, adică inflamaţie cu membrană. În 1883, Klebs, studiind preparate din secţiuni de falsă membrană difterică, observă în aceste secţiuni prezenţa unui bacil pe care-l descrie fără a-i da o semnificaţie deosebită. Un an mai tîrziu, Löffler, îndrumat de maestrul său Robert Koch, însămînţează fragmente din falsă membrană pe ser coagulat de bou şi reuşeşte izolarea bacilului difteric. Löffler se arată însă foarte rezervat asupra specificității bacilului izolat, deoarece găsește un bacil asemănător în faringele unui om sănătos.

În anii 1888–1890, Roux și Yersin dovedesc pe cale experimentală specificitatea bacilului descoperit de Klebs și Löffler și rolul lui în etiologia difteriei. Acești cercetători reproduc experimental la iepure paraliziile difterice și arată că filtratele de culturi pe mediu lichid, complet lipsite de bacterii, sînt capabile să producă aceleași fenomene ca cele determinate de inocularea culturii totale.

Această descoperire a deschis o cale nouă în cercetările de bacteriologie, pentru că alături de noțiunea cunoscută a virulenței microbului apărea o proprietate nouă, aceea de toxinogeneză.

Cunoașterea acestei proprietăți a bacteriilor patogene lăsa să se întrezărească posibilitatea ca prin folosirea judicioasă, în cantități mici și repetate, de toxină, să se ajungă la imunizarea împotriva difteriei. În 1890, Behring și Kitasato reușesc să vaccineze animale de laborator cu toxină difterică și descoperă existența în serul animalelor vaccinate a unor anticorpi specifici — antitoxinele —, care le conferea imunitatea specifică împotriva difteriei.

La congresul de bacteriologie de la Budapesta, în 1894, Bergman, Roux, Martin și Chailloux arată că au utilizat pentru prima dată serul antitoxic al lui Behring în clinica difteriei, cu rezultate bune.

Preocupați de obținerea unei toxine-antigen cît mai puternice pentru imunizarea cailor, Park, Williams și Ana Williams, în 1894, izolează dintr-un caz benign de difterie o tulpină de *C. dyphtheriae* cu înaltă capacitate toxigenă — tulpina Park-Williams 8 — care astăzi este larg folosită în toate laboratoarele producătoare de ser și vaccin antidifteric.

În 1895, descoperirea lui Victor Babeș asupra valorii imunizante amestecului toxină-antitoxină difterică pune bazele imunizării antitoxice active.

În 1902, Danysz a descoperit că mecanismul neutralizării toxinei de către antitoxină se desfășoară după un anumit mecanism. Astfel, toxicitatea pentru țesutul animal a unui amestec de toxină cu antitoxină depinde nu atît de proporția în care se realizează amestecul toxinei cu antitoxina (1 DLM este neutralizat de 100 U.A.), cît mai ales după felul în care se realizează acest amestec. O cantitate fixă de toxină este neutralizată complet dacă se adaugă dintr-o dată cantitatea echivalentă de antitoxină. De îndată ce amestecul toxinei cu cantitatea echivalentă de antitoxină nu se efectuează dintr-o dată, ci se adaugă în 2 sau 3 porțiuni la interval de 15 minute, amestecul rămîne toxic pentru animal. Acest amestec toxic, lăsat însă cîteva zile în repaus, devine treptat netoxic prin disociație și recombinare. Deci, toxina și antitoxina se combină în proporții variabile în funcție de condițiile în care se realizează amestecul, iar complexul format se disociază lent. Această comportare a complexului toxină-antitoxină difterică a fost denumit fenomenul Danysz.

În 1913, Behring confirmă lucrările lui Babeș și demonstrează posibilitatea vaccinării în masă a copiilor prin amestecuri subneutralizate de toxină-antitoxină.

Tot în 1913, Schick imaginează testul pentru controlul imunității instalată prin vaccinare.

Metoda Behring a fost folosită pentru vaccinări în masă de către Williams şi Park în 1922, în Statele Unite ale Americii. Deşi s-a obţinut o imunitate bună, accidentele care au survenit datorită persistenţei unui exces de toxină în unele amestecuri, printr-o disociere inegală a complexului toxină-antitoxină, au pus la îndoială eficacitatea acestei metode.

Un progres deosebit în combaterea difteriei a fost realizat în anul 1925 de către G. Ramon care, folosind rezultatele lucrărilor lui Loewenstein privind acţiunea detoxifiantă a aldehidei formice asupra toxinei difterice, a obţinut formoltoxoidul sau anatoxina difterică.

Datorită acestor importante descoperiri, difteria a putut fi bine cunoscută şi combătută cu succes în majoritatea ţărilor din lume. Vaccinarea antidifterică, devenită obligatorie, a influenţat considerabil morbiditatea şi mortalitatea specifică.

În ţara noastră, aplicarea seroterapiei de către V. Babeş în 1895 face ca cifra letalităţii prin difterie să scadă de la 60—70 la 20%. Prin aplicarea vaccinărilor obligatorii cu anatoxină Ramon, din anul 1934, cifra morbidităţii scade de la 38,9 în 1934 la $9{,}6^{0}/_{0000}$ în 1941, iar mortalitatea scade de la 5,2 în 1934 la $3{,}1^{0}/_{0000}$ în 1941.

Cercetările lui Freeman, Groman, Hewitt, Narbutowitz şi Moldawski au semnalat importanţa deosebită pe care o are bacteriofagul difteric în epidemiologia difteriei, ca factor inductor al toxinogenezei la tulpinile netoxigene de *C. dyphtheriae*, în cadrul fenomenului de variabilitate microbiană.

Habitat. *C. dyphtheriae* se localizează în mod obişnuit pe mucoasa rinofaringiană, dar uneori şi pe mucoasa oculară sau vulvară. La bolnavi se întîlneşte în număr mare în exsudatul fibrinoleucocitar care constituie falsa membrană. La convalescenţi şi purtătorii sănătoşi, se localizează tot pe mucoasa rinofaringiană, unde poate fi găsit o perioadă variabilă de timp.

Localizarea pe tegumente este excepţională şi produce difteria cutanată. *C. dyphtheriae* este tipul clasic de microb patogen care rămîne localizat la poarta de intrare în organism; în unele cazuri însă a putut fi izolat prin hemocultură.

Caractere morfologice şi tinctoriale. *C. dyphtheriae* are aspectul unui bastonaş drept sau uşor incurbat, măciucat, de dimensiuni între 2 şi 6 μ lungime şi 0,5 μ grosime. Frotiul efectuat dintr-o cultură de 24 de ore de pe mediul Löffler oferă morfologia microscopică cea mai caracteristică, deosebind trei tipuri morfologice de *C. dyphtheriae*: bacili lungi, zvelţi, incurbaţi, măciucaţi, sau forme scurte şi mijlocii. Formele scurte prezintă extremităţile rotunjite, uneori ovalari sau cocobacilari; cele mijlocii şi lungi prezintă adeseori una sau ambele extremităţi umflate în formă de măciucă şi iau un aspect de halteră. Aşezarea este caracteristică, amintind aspectul caracterelor cuneiforme sau al literelor X, Y, L, V. Adeseori bacilii sînt grupaţi sub forma unor palisade sau în grămezi, care se aseamănă cu beţe de chibrituri răsturnate pe masă.

După observaţiile lui Hill, această dispoziţie specială este datorită separării incomplete a celulelor în cursul diviziunii.

C. dyphtheriae manifestă un accentuat pleomorfism, care depinde de vîrsta culturii, precum şi de compoziţia mediului de cultivare. Modul diferit de preparare, folosirea unui substrat diferit, a unor temperaturi de sterilizare variabile sau de ser insuficient încălzit etc. pot determina apariția formelor cocobacilare. În culturile vechi apar forme de involuție, filamentoase sau cu ramificații.

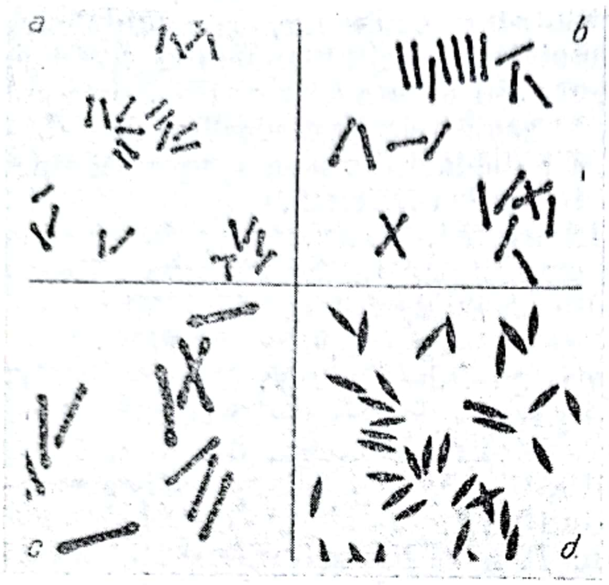


Fig. 107. — Tipurile morfologice de *C. diphtheriae* (schematic);
a) bacili scurți; b) bacili mijlocii; c) bacili lungi; d) *C. hoffmanni*

C. dyphtheriae este imobil, nesporulat, lipsit de capsulă. Se colorează bine cu coloranții uzuali de anilină. Datorită distribuției neregulate a protoplasmei în celula bacteriană, *C. dyphtheriae* posedă o structură internă heterogenă, din care cauză coloranții se fixează neuniform prilejuind aspectul unei colorații segmentare.

O caracteristică morfologică importantă a speciei *C. dyphtheriae* este prezența corpusculilor metacromatici, descriși de Babeș (1886) și Ernst (1888). O celulă microbiană posedă 2—3 corpusculi care au tendința de a se situa la poli. Corpusculii se colorează metacromatic cu albastru de metilen Löffler sau albastru-brun cu colorația Neisser. Acești corpusculi Babeș-Ernst au fost considerați multă vreme patognomonici pentru specia *C. dyphtheriae*. Ulterior s-a constatat că pot fi întîlniți și la alte specii de corinebacterii.

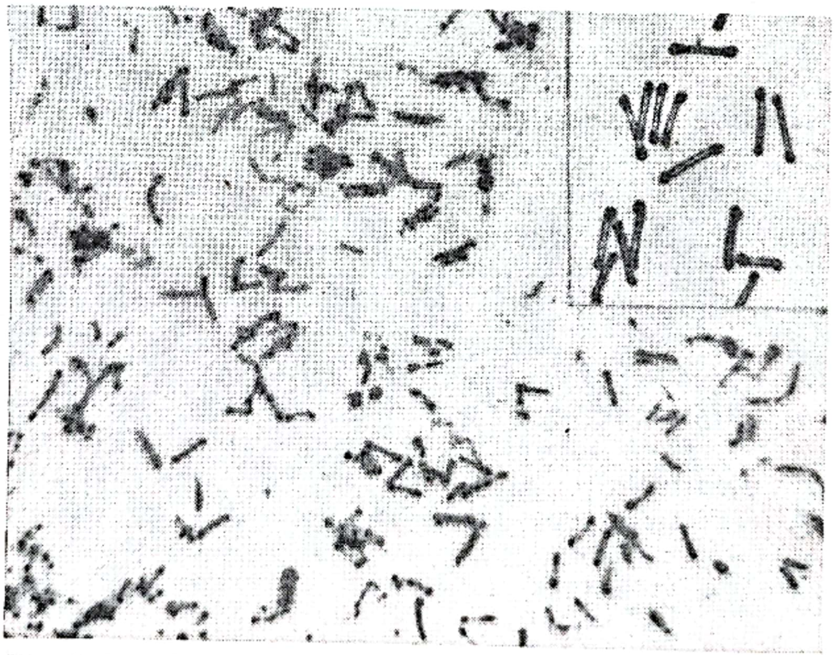


Fig. 108. — *C. diphtheriae* — frotiu din cultură, colorație Del Vecchio pentru corpusculii metacromatici Babeș-Ernst.

Adevărata semnificație și natura chimică a acestor corpusculi nu sînt încă precizate. Au fost considerați fie ca fragmente de acid nucleic, fie ca granule de volutină. *C. dyphtheriae* se colorează gram-pozitiv la limită. Această proprietate ajută la diferenţierea de difterimorfi şi mai ales de *C. hoffmanni*, care păstrează intens violetul din coloraţia Gram.

Caractere de cultură. Deşi *C. dyphtheriae* este privit ca o singură specie în cadrul genului, după felul creşterii pe mediile de cultură, precum şi din unele caracteristici de metabolism se deosebesc trei tipuri diferite: tipul *gravis*, *mitis* şi *intermedius*.

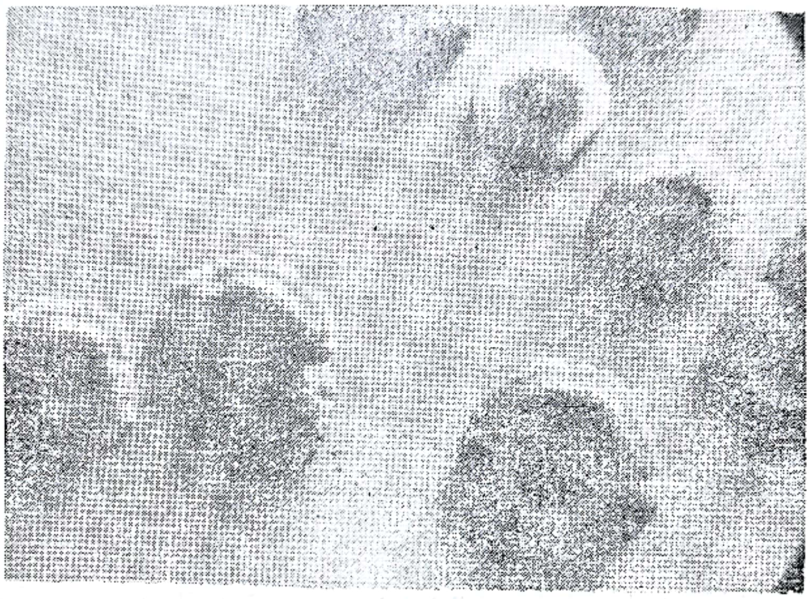


Fig. 109. — *C. diphtheriae* tip *gravis* — colonii de 48 de ore pe mediul Löffler — aspect de margaretă.

În 1931, Anderson, Happold, McLeod şi Thompson, folosind mediul geloză-sînge-telurit, izolează în mediu epidemic două tipuri de bacili difterici care se deosebeau prin aspectul creşterii pe mediile de cultură, capacitatea de fermentare a amidonului, glicogenului şi prin activitatea hemolitică.

Autorii sus-citaţi au denumit aceste tulpini *C. dyphtheriae* tip *gravis* şi *mitis*, şi au încercat să facă o corelaţie între forma de creştere şi forma clinică a bolii.

Ulterior Anderson, Cooper, Happold şi McLeod (1933) constată existenţa unor tulpini intermediare, care nu corespundeau nici tipului *gravis*, şi nici tipului *mitis*, şi pe care l-au denumit tipul *intermedius*.

Robinson şi Marshall (1934) confirmă existenţa celor trei tipuri pe care le consideră varietăţi stabile ale speciei şi fac constatarea că tipul *intermedius* poate provoca forme de boală la fel de grave ca şi tipul *gravis*.

Frobisher (1945) descrie un al 4-lea tip de bacili difterici, deosebit de cele 3 tipuri cunoscute pînă atunci, caracterizat prin colonii mici şi fermentarea lentă a glucozei, pe care l-a denumit tipul *minimus*.

Pe mediul geloză-sînge-telurit de K, pe care au fost observate şi descrise cele trei tipuri de bacili difterici, ele se prezintă astfel:

— *tipul gravis*: colonii negre, plate, cu suprafaţa rugoasă, uneori cu tendinţă la acuminare şi ombilicare cu striuri radiare, margini crenelate şi consistenţă friabilă, asemănătoare cu floarea de margaretă. Uneori însă coloniile apar plate, de culoare negru-cenușiu, cu margini translucide și ușor ondulate. Această morfologie corespunde de obicei formelor *gravis* netoxigen;

— *tipul mitis*: colonii negre, rotunde, bombate, cu margini regulate și suprafața netedă, strălucitoare. Consistența coloniilor este untoasă, se emulsionează ușor;

— *tipul intermedius*: colonii negre, plate, cu centrul acuminat, mai închis la culoare. Periferia coloniei este ușor transparentă, iar marginile sînt regulate. Suprafața este granulară, iar consistența este intermediară între friabilă, a tipului *gravis*, și untoasă a tipului *mitis*.

În afară de cele trei tipuri obișnuite sub care se prezintă *C. dyphtheriae*, tipul *minimus* se izolează sub forma unor colonii de talie mică de 0,5 mm Ø; morfologia coloniilor este asemănătoare tipului *mitis*, însă mai plate și translucide. Caracteristicile sînt dimensiunile reduse și creșterea întîrziată.

Pe geloză simplă, *C. dyphtheriae* se dezvoltă sub forma unor colonii mici, translucide, necaracteristice, care prin învechire devin opace, albicioase. Pe gelatină, *C. dyphtheriae* se dezvoltă mai lent, datorită temperaturii de incubație scăzute, formînd colonii mici asemănătoare celor de pe geloză simplă. Nu lichefiază gelatina. Pe geloză-sînge, *C. dyphteriae* se dezvoltă sub forma unor colonii albe cu nuanțe spre cenușiu, cu morfologia coloniei corespunzătoare tipului de *C.dyphtheriae* pe care o reprezintă.

Uneori, coloniile de tip *mitis* și *gravis* se înconjoară cu o zonă de hemoliză. Pe mediul Löffler, creșterea *C. dyphteheriae* este preferențială, în sensul că se obțin colonii după 14-18 ore; coloniile apar ca mici picături opace, care au fost comparate cu picăturile de spermanțet. Adăugarea de cistină 0,001% la acest mediu favorizează în mod deosebit dezvoltarea preferențială a *C. dyphtheriae*.

Pe mediul Clauberg selectiv și diferențial, morfologia coloniilor este mai puțin bine diferențiată; în schimb, datorită fermentării glucozei și virajului indicatorului, aceste colonii de aspect negru se înconjoară de un halou albastru caracteristic. În mediu lichid, *C. dyphtheriae*, tip *gravis*, formează peliculă, sedimentează lăsînd bulionul limpede sau ușor tulbure; tipul *mitis* tulbură uniform bulionul în primele 24 de ore, dar apoi sedimentează, producîndu-se o clarificare parțială a bulionului; tipul *intermedius* tulbură uniform bulionul, formează un sediment grunjos și prezintă un inel sau văl subțire la suprafața mediului lichid.

Caractere biochimice și de metabolism. Din studiul caracterelor de metabolism efectuate pe medii sintetice, s-a constatat că *C. dyphtheriae* necesită pentru creștere o serie de factori, ca acid nicotinic, acid pantotenic, acid pimelic, biotină, vitamină PP, histidină și alanină, iar pentru producerea de toxină, cîțiva aminoacizi indispensabili printre care cistină, triptofan și acid aspartic. În acest scop, la mediile de cultură se adaugă proteine animale cu structură complexă: sînge sau ser.

C. dyphtheriae este un germen aerob și microaerofil (anaerob facultativ). Creșterea și mai ales elaborarea de toxină în special este favorizată de prezența oxigenului. Limitele de temperatură la care se dezvoltă sînt cuprinse între 15 și 40°, cu un optimum la 36-37°, iar pentru producerea de toxină 33-34°. Concentrația ionilor de hidrogen din mediu, care permite dezvoltarea *C. dyphtheriae*, este cuprinsă între pH 5,7 şi pH 8,7, cu un optimum pentru elaborarea de toxină între 7,8 şi 8,2.

C. dyphtheriae produce o exotoxină puternică difuzibilă, care este neutralizată *in vivo* şi *in vitro* de serul antitoxic specific.

Elaborează o cistinază capabilă de a hidroliza cistina, cu punere în libertate de H_2S. Această capacitate specifică este folosită drept criteriu de diferenţiere cu speciile de difterimorfi, care nu elaborează cistinază. Nu reduce nitraţii în nitriţi, nu hidrolizează ureea, nu elaborează fosfatază, nu lichefiază gelatina, nu produce gaz.

Capacitatea de fermentare a carbohidraţilor este folosită în scop diferenţial faţă de speciile din acelaşi gen şi între diversele tipuri de *C. dyphtheriae*. Zaharurile obişnuit folosite în acest scop sînt, dintre dizaharizi : glucoza, zaharoza, manita, maltoza, levuloza şi dintre polizaharizi : dextrina, amidonul şi glicogenul.

C. dyphtheriae fermentează în mod constant, glucoza, maltoza, levuloza şi nu fermentează zaharoza, spre deosebire de *C. xerose* care fermentează toate aceste zaharuri şi *C. hoffmannii* care nu fermentează nici unul.

În cadrul speciei *C. dyphtheriae*, tipul *gravis* fermentează dextrina, amidonul şi glicogenul, tipul *mitis* nu fermentează nici un polizaharid, iar tipul intermedius fermentează dextrina.

Majoritatea tulpinilor de *C. dyptheriae*, tip *mitis*, manifestă o activitate hemolitică faţă de hematiile de iepure, oaie şi cal.

C. dyphtheriae tip *gravis* este de obicei nehemolitic, iar tipul *intermedius* în mod constant nu este hemolitic.

Rezistenţa la agenţii fizici, chimici şi biologici. Rezistenţa *C. dyphtheriae* faţă de agenţii fizici şi chimici este asemănătoare în general, cu aceea a celorlalte bacterii nesporulate. Rezistenţa faţă de radiaţiile luminoase şi ultraviolete este aproximativ egală cu aceea a *S. typhi* şi a streptococilor. Posedă însă o rezistenţă marcată faţă de uscăciune. În fragmente uscate de falsă membrană şi la adăpost de lumină, rămîne viabil cîteva luni. Rezistă multă vreme în lapte, dar această rezistenţă este în funcţie de pH-ul laptelui şi de gradul de contaminare a laptelui.

Antisepticele folosite în concentraţiile uzuale distrug *C. dyphtheriae* în cîteva minute.

Rezistenţa *C. dyphtheriae* în mediul extern este favorizată de învelişul albuminos pe care îl oferă exsudatele şi produsele patologice. Obiectele contaminate, în special jucăriile copiilor, pot fi cauza ivirii de noi cazuri de difterie, chiar după cîteva luni. În mediile de cultură se conservă multă vreme, mai ales la temperaturi joase ; liofilizat, poate fi conservat cîţiva ani.

Cultura în bulion moare după 30 de minute la 58° ; cultura uscată rezistă pînă la 95°.

C. dyphtheriae este sensibil la acţiunea bacteriostatică a penicilinei, tirotricinei, streptomicinei şi tetraciclinei. Pentru sterilizarea rino-faringelui purtătorilor de *C. dyphtheriae* se folosesc în ultimul timp nitrofuranul, cloramfenincolul şi mai ales eritromicina.

C.dyphtheriae este sensibil la acţiunea bacteriofagilor specifici. În ţara noastră, A. Saragea şi colaboratorii au reuşit să realizeze în ultimii ani o schemă de lizotipie la C. *dyphtheriae*. Metoda foloseşte 24 de preparate fagice care subdivid tipurile de bacili difterici în 19 lizotipuri, dintre care 3 lizotipuri fac parte din tipul *mitis*, 3 lizotipuri din tipul *intermedius*, un lizotip *gravis* netoxigen și 12 lizotipuri *gravis* toxigene.

Structura antigenică. Deosebirile de ordin morfologic și al caracterelor de cultură la tipurile de *C. dyphtheriae* au ridicat ipoteza unor eventuale deosebiri și în structura lor antigenică.

Cercetarea aglutinabilității prin seruri specifice s-a lovit de dificultatea obținerii de suspensii omogene de bacterii, mai ales la tipul *gravis*.

Numeroși cercetători au încercat să obțină rezultate prin metoda aglutinării, individualizînd tipuri serologice care, după autori, variau între 5 și 11. Ewing constată existența a 4 tipuri serologice de *C. dyphtheriae gravis*, 5 tipuri de *C. dyphtheriae mitis* și 2 tipuri de *C. dyphtheriae intermedius*. Între 1938 și 1940, Wong și Tung, cercetînd structura chimică a *C. dyphtheriae*, ajung la concluzia că această specie posedă un polipeptid cu specificitate antigenică de tip și fracțiuni antigenice de natură lipidopolizaharidică cu specificitate de grup.

În 1942, Tarnowski, preparînd seruri aglutinante pe iepure, cu 9 tulpini de tip *gravis*, 5 de tip *intermedius* și 13 de tip *mitis*, ajunge la concluzia că tipul *gravis* se subdivide în 9 subtipuri serologice, tipul *intermedius* în 5 subtipuri și tipul *mitis* în 13 subtipuri.

În 1947, Hewitt, folosind aglutinarea cu seruri adsorbite, conchide că tipurile *gravis*, *mitis* și *intermedius* sînt în realitate „grupe'' antigenice care conțin fiecare mai multe tipuri serologice, numărul lor ajungînd la 57.

Cercetările din 1950 ale lui Bielozierski, Korceaghin și Smirnov deosebesc la *C. dyphtheriae* existența unui antigen „K'', termolabil, cu specificitate de tip, situat superficial și legat de fracțiunea proteică, și a unui antigen „O'', termostabil, cu specificitate de grup, legat de fracțiunile polizaharidice.

Tulpinile *gravis* sînt în general mai bogate în antigen de suprafață și din această cauză mai antigenice.

Oeding (1950) descrie un antigen „O'', termostabil, comun celor 3 tipuri și un antigen termolabil de suprafață, specific de tip. Cummins (1954) găsește la tulpinile *mitis* de *C. dyphtheriae* un antigen de suprafață termolabil, responsabil de aglutinarea corpilor bacterieni și un antigen profund termostabil, comun și celorlalte tipuri de *C. dyphtheriae*.

Cercetătorul polonez Kwapinski (1956) arată că fracțiunea PW a toxinei difterice purificate reacționează cu serul aglutinant antidifteric.

În 1963, C. Barber, A. Saragea, Gh. Calalb și colaboratorii, prin studii imunologice de difuziune în gel, stabilesc identitatea antigenelor endobacteriene ale *C. dyphtheriae* cu antigenele secundare care însoțesc exotoxina.

Din punct de vedere teoretic și practic, constatarea afinității antigenice între substanțele conținute în toxina difterică și corpii bacilari este de mare importanță pentru seroterapia antidifterică.

Studiile asupra structurii antigenice a *C. dyphtheriae*, deși au adus date valoroase, nu au putut determina totuși elaborarea unei metode practice de serotipie, atît de necesară urmăririi fenomenelor epidemiologice complexe pe care le ridică astăzi această infecție.

Caractere de patogenitate. Patogenitatea *C. dyphtheriae* se datorește proprietății sale de a elabora exotoxină. Puterea sa de invazie este redusă.

Microbul se multiplică la poarta de intrare, unde elaborează toxina care provoacă în primul rînd leziunile locale.

Toxina difterică elaborată *in situ* fiind foarte difuzibilă, trece repede în circulație, producînd alterări importante în țesutul miocardic, sistemul nervos central, rinichi și capsule suprarenale, pentru care manifestă un tropism deosebit.

Dacă se inoculează la cobai, fie o cultură totală de bacili difterici în mediu lichid, fie numai filtratul culturii (din care deci s-au îndepărtat corpii microbieni), fenomenele observate sînt aceleași și leziunile din organe identice. Aceasta înseamnă că patogenitatea bacilului difteric este datorită mai ales exotoxinei pe care microbul o pune în libertate în cursul dezvoltării. Se constată însă că printre tulpinile toxigene de *C. dyphtheriae* există diferențe foarte mari din punctul de vedere al patogenității. Unele tulpini produc forme de boală de o gravitate excepțională, altele forme medii sau ușoare. Încercînd să explice aceste diferențe, Müller constată că tulpinile *gravis* elaborează *in vitro* cantități mari de exotoxină numai în prezența unor concentrații adecvate de Fe. Zinemann ajunge la concluzia că în cazurile de boală, concentrația mare de Fe în țesuturi este elementul hotărîtor pentru elaborarea masivă de toxină difterică.

Pe lîngă exotoxina difuzibilă în mediu, s-a mai pus în evidență de Frobisher și Parsons și o endotoxină strîns legată de corpul bacterian. Inoculată subcutanat la cobai, endotoxina produce o infiltrație locală urmată de abcedare, însă nu provoacă nici necroză locală și nici leziuni caracteristice în organe. Endotoxina rezistă la 100° și nu este neutralizată de serul antidifteric antitoxic.

În 1940, O'Meara arată că filtratele de cultură ale *C. dyphtheriae* conțin 2 componente, pe care le denumește toxina *A* și toxina *B*. Toxina *A* este exotoxina difterică clasică, iar toxina *B* este alcătuită din 3 factori:

— un factor cu acțiune necrotică locală (endotoxina Frobisher și Parsons);

— o hialuronidază (factorul solubil Duran-Reynals și McClean);

— un factor hemolitic.

Existența acestor două componente în toxina difuzibilă a *C. dyphtheriae* determină apariția simptomelor caracteristice intoxicației difterice. Tulpinile de *C. dyphtheriae* nu conțin însă în mod egal aceste componente toxice. De pildă, tulpina PW$_8$, folosită pentru producția de toxină, elaborează aproape exclusiv componenta toxică A, în schimb majoritatea tulpinilor *gravis*, izolate din focarele de difterie, produc în cantitate mare componenta toxică B.

Nieggemeyer (1961) acordă o importanță deosebită în epidemiologia difteriei componentei B și mai ales factorului de difuziune de tipul hialuronidazei, pe care îl denumește „invazină". El consideră că numai prin prezența anticorpilor neutralizanți față de toxina B se poate explica mecanismul imunității antidifterice la indivizii care prezintă titruri antitoxice față de toxina A cu mult sub limita titrului imun protector.

Acțiunea patogenă a toxinei difterice poate fi evidențiată nu numai *in vivo*, ci și *in vitro*, pe culturi de țesuturi. Încă din 1913, Levaditti și Muttermilch au arătat că creșterea fibroblaștilor din embrionul de găină este inhibată de toxina difterică și că acest efect este neutralizat de antitoxina specifică. Penso și Vicari (1957) semnalează efectul citopatogen al toxinei pe linii celulare cultivate în strat monocelular. O'Kabe și Terruki (1957) și apoi P. Sousa și La Placca (1957) sugerează folosirea efectului citopatogen al toxinei difterice asupra celulelor cultivate *in vitro*, pentru titrarea serurilor antitoxice.

Bonventu (1961) studiază pe liniile celulare KB și Chang mecanismul efectului citopatogen al toxinei difterice și ajunge la concluzia că toxina difterică acționează printr-o scădere considerabilă a sintezei compușilor energetici și prin afectarea metabolismului fosforului în sensul inhibiției proceselor de fosforilare. Astfel celula este lipsită de energia necesară proceselor de biosinteză și de menținere a integrității structurale.

Producerea toxinei este realizată în general de tulpinile lizogene.

De la descoperirea epocală a lui Freeman (1951) asupra conversiunii tulpinilor de *C. dyphtheriae* de la netoxigenitate la toxigeneză sub acțiunea bacteriofagului, există consens unanim că fagul este determinanta genetică care guvernează toxinogeneza.

Prepararea toxinei și anatoxinei difterice. Producerea *in vitro* a unei exotoxine difterice cu înaltă valoare antigenică a constituit și constituie o preocupare permanentă pentru toate laboratoarele angajate în producția industrială a toxinei, în vederea realizării unui vaccin antidifteric de calitate.

Din 1895 cînd W. Park și A. Williams au izolat tulpina PW_8 cu o înaltă capacitate de toxinogeneză *in vitro*, în toate laboratoarele din lume producătoare de toxină-anatoxină se folosește ca tulpină standard, tulpina PW_8.

Ulterior s-a observat că valorile toxinogenezei sînt foarte variabile, în funcție de compoziția mediului folosit pentru cultivarea tulpinii PW_8 și de procedeul folosit pentru obținerea toxinei.

Din tulpina inițială PW_8 s-au obținut prin procedee laborioase de selecție o serie de variante cu capacitatea de toxinogeneză mult ameliorată, care au fost denumite PW_8 Toronto, PW_8 Albany, PW_8 Paris, PW_8 Weissensee, PW_8 SM_1 etc.

Pentru producerea toxinei în cultură, au fost preconizate numeroase medii, dintre care cele mai valoroase sînt mediul Pope-Lingood (1939) și mediul semisintetic Mueller-Miller cu bază de hidrolizat de cazeină. Prin adaos de factori de creștere, acetat de Na sau lactat de Na, maltoză, drojdie de bere și o cantitate definită de Fe, s-a realizat o ameliorare marcată a calității și cantității toxinei produse.

Pappenheimer și Johnson (1933), apoi Mueller (1939) au demonstrat importanța concentrației optime de Fe în mediul de cultură pentru producerea toxinei. La o concentrație scăzută de Fe nu se produce creșterea, iar la o concentrație prea ridicată de Fe, deși se produce o creștere abundentă, toxinogeneza scade pînă la dispariție.

Barksdale și Pappenheimer (1954) semnalează starea de lizogenie a tulpinii PW_8 care poartă un fag simbiotic și atribuie prezenței acestui fag capacitatea sa înaltă de toxino-geneză.

În 1961, Barksdale ajunge la concluzia că în producerea de toxină se pot deosebi 2 stadii : primul asociat cu dinamica dezvoltării celulei bacteriene și a profagului și al doilea caracterizat prin creșterea liniară a producției de toxină. Durata perioadei de latență a profagului are o importanță deosebită pentru sinteza toxinei și randament. Adăugarea de factori ca proflavină, care întîrzie maturarea fagului și liza celulei bacteriene contribuie la obținerea unor cantități mari de toxină. Conținutul scăzut de Fe din celula bacteriană induce transformarea rapidă a profagului în fag matur și scade randamentul producerii toxinei.

Dintre factorii de mediu care influențează producerea de toxină în condițiile unui conținut corect de substanțe în mediul de cultură, sînt aerarea, pH-ul și temperatura de incubație.

Pentru îndeplinirea acestor condiții, cultivarea se face fie în culturi statice în strat subțire și în recipiente cu mare suprafață de contact cu aerul (baloane Fernbach), fie în culturi submerjate, în volume mari, barbotate continuu cu aer steril; pH-ul optim necesar producerii de toxină este 7,8—8, iar temperatura de incubație optimă între 34 și 35°.

Prin procedeul culturilor statice, folosind tulpina PW$_8$ Weissensee, cultivată în mediul Pope-Lingood, se obțin toxine a căror valori variază între 90—120 Lf/ml și 7 000—10 000 DLM/ml.

Exotoxina difterică este o proteină termocoagulabilă, labilă față de diverși agenți fizici și chimici. Toxina difterică este distrusă prin încălzire la 70° în 30 de minute. Prin păstrare la termostat, valoarea toxică a unui filtrat scade în cîteva zile, apoi se stabilizează. În condiții de păstrare la temperatura camerei (20—26°), se degradează rapid, pierzînd cea mai mare parte din toxicitate. Păstrată la 0—5°, la adăpost de lumină și sub toluol, își pierde din toxicitatea inițială, la început într-un ritm rapid, apoi lent, astfel încît în 1—2 ani rămîne cu o toxicitate mai scăzută, dar stabilizată; în timp ce valoarea toxică scade în aceste condiții cu 50—70%, valoarea sa antigenică se păstrează în limite mult mai strînse, pierderea globală nedepășind 15%. Această transformare a toxinei, chiar în condiții obișnuite de păstrare, într-un produs netoxic dar antigenic a fost denumită de Ehrlich „toxoid”.

Toxina se degradează la lumină și sub acțiunea razelor ultraviolete. Agenții chimici și oxidanți, triclorura de iod, hipocloridul de Na, o atenuează. Acizii tari o distrug. Hidrocarburile ciclice, benzenul, toluolul și xilolul nu influențează defavorabil toxina, de aceea pentru stabilizare toxina se păstrează în recipiente închise la culoare, sub un strat protector de toluol sau benzen.

Valoarea unei toxine se exprimă în unități toxice DLM/ml (doza limită mortală) determinată *in vivo* pe cobai și prin unități antigenice Lf/ml (Limes floculans) determinate prin metoda Ramon de floculare *in vitro*. Unitatea floculantă se consideră în raport direct proporțional cu unitatea antitoxică: 1 Lf = 1 U. A. Unitatea antitoxică a fost stabilită de Ehrlich după cantitatea de antitoxină care neutralizează 100 DLM. Deși există această corelație între Lf și DLM (1 Lf = 100 DLM), Ehrlich a arătat că într-o toxină care se învechește acest raport se modifică datorită transformării treptate a toxinei în toxoid. Glenny, bazat pe aceste constatări, sugerează folosirea unui produs complet atoxic dar cu proprietăți imunizante, la imunizarea cailor producători de ser antidifteric. Utilizarea de către Loewenstein a formaldehidei pentru detoxifierea toxinei tetanice i-a sugerat lui Ramon folosirea acestei substanțe pentru obținerea produsului atoxic al anatoxinei difterice.

Anatoxina, produs lipsit de toxicitate, se obține prin formolarea filtratului de cultură al tulpinii PW$_8$ în proporție de 4—5‰. Amestecul toxină + formol se menține 30—40 de zile la termostatul de 39—40°, interval în care se produce detoxifierea completă. Anatoxina își păstrează valoarea antigenică, măsurată prin unități Lf; capacitatea floculantă a toxinei este paralelă cu puterea sa imunogenă. Anatoxina prezintă următoarele caracteristici :

— inocuitate absolută : inoculată la cobai nu provoacă reacție locală sau generală ;

— valoare antigenică ridicată, exprimată prin conținut ridicat de Lf/ml ;

— capacitate imunogenă mare, care provoacă apariția anticorpilor antitoxici în titruri ridicate în serul animalelor imunizate experimental.

Anatoxina rezistă o oră la încălzire de 65°, rezistă la lumină, este stabilă și ireversibilă.

Purificarea și concentrarea toxinei difterice. Toxina difterică brută poate fi concentrată și purificată. Prin congelare sau evaporare la o temperatură scăzută, se obține o concentrare fără purificare.

Pentru concentrare și purificare se utilizează substanțe ca sulfatul de amoniu sau acidul tricloracetic.

Studiul compoziției chimice după purificarea toxinei difterice se efectuează prin electroforeză și ultrafiltrare.

Eaton, prin precipitare cu clorură de cadmiu, a obținut o toxină purificată, din care 0,0034 mg reprezintă o unitate floculantă și 0,00002 — 0,000016 mg o doză limită mortală (DLM).

Boivin a precipitat toxina cu acid tricloracetic la rece. Produsul obținut este higroscopic, incolor, se dizolvă ușor la pH 8; nu conține polizaharizi, nici lipoizi ; conține 15,1% azot, 0,1% fosfor și 0,5% cenușă ; 0,003 mg din această substanță reprezintă o unitate floculantă de toxină difterică.

Alți autori — Pappenheimer, Johnson, Robinson — cultivînd *C. dyphtheriae* pe medii sintetice, ajung la aceeași cifră de 0,003 mg pentru o unitate floculantă.

C.G. Pope și M.F. Stevens (1953) au obținut toxina difterică sub formă cristalizată.

Pentru obținerea anatoxinei difterice purificate prin detoxifiere sub acțiunea formolului și căldurii, se folosește în ultimul timp, în locul filtratului de cultură, un produs purificat și concentrat de toxină difterică. Metoda permite realizarea unui antigen calitativ mai bun, care se detoxifică într-un interval de timp mai scurt și permite folosirea unor doze imunizante mai reduse ca volum.

Infecția experimentală. Primele încercări experimentale pe animale de laborator se datoresc lui Löffler (1884) care, în urma izolării B. difteric din cazurile clinice de difterie, inoculează germenul izolat la animale, încercînd să reproducă infecția prin inocularea intratraheală la iepuri și porumbei.

O etapă importantă în cunoașterea infecției difterice a fost marcată de experiențele lui Roux și Yersin (1888) care, prin inocularea filtratului de cultură la cobai, au evidențiat prezența toxinei care produce semnele de intoxicație caracteristică. Aceste experiențe au confirmat observația lui Löffler, că moartea nu se produce prin diseminarea bacililor difterici şi au reprodus fenomenele de paralizie observate la om.

Dintre animalele de laborator, cele mai sensibile sînt cobaiul şi iepurele. Păsările mici şi maimuţele sînt la fel de sensibile ca şi cobaiul. Deşi şoarecele şi şobolanul sînt consideraţi refractari, totuşi Frobisher a dovedit că prin inoculare pe cale intracerebrală şoarecele este sensibil.

Dacă se inoculează pe cale subcutanată la cobai o cultură în bulion de B. difterici, se produce în primele 24 de ore la locul de incolulare un edem al ţesutului, iar moartea se produce în 1—3 zile. La autopsia cobaiului se constată, la locul de inoculare, un edem gelatinos, uneori fibrinohemoragic, o adevărată falsă membrană, în care se poate găsi *C. dyphtheriae*. Se mai constată o congestie puternică a viscerelor, uneori revărsat sero-sanguinolent în pleură, pericard şi peritoneu, iar capsulele suprarenale sînt mărite şi intens congestionate. Aceste fenomene sînt specifice intoxicaţiei cu toxină difterică şi se datoresc, fie toxinei preexistente în cultură, fie celei elaborate *in situ*, deoarece inocularea de bacili toxigeni spălaţi produce aceleaşi fenomene.

Leziunile histopatologice specifice provocate de intoxicaţia difterică la cobai sînt reprezentate de degenerescenţa muşchiului cardiac şi a diafragmului, precum şi de congestie şi hemoragii în capsulele suprarenale. Aceste leziuni se întîlnesc şi în boala la om, iar acţiunea directă a toxinei difterice asupra muşchiului cardiac reprezintă cauza principală a morţii în difterie.

Dacă doza de toxină inoculată subcutanat conţine mai puţin de 1 DLM, la locul inoculării edemul dispare în cîteva zile şi apare o escară, care se elimină şi este urmată de cicatrizarea ţesutului. Animalul însă slăbeşte progresiv şi după 15 zile poate prezenta paralizii periferice. Animalul poate muri în acest interval şi la autopsie se constată leziuni de degenerescenţă în miocard.

Toate aceste fenomene de intoxicaţie pot fi prevenite prin administrare prealabilă de antitoxină.

Folosind inocularea intracerebrală la şoarece, Frobisher, Parsons şi Updyke (1950) demonstrează virulenţa tulpinilor netoxigene de *C. dyphtheriae* izolate de la bolnavi. Prin inocularea a 0,2 ml cultură în bulion pe această cale, animalele prezintă fenomene nervoase : ataxie şi contracturi spastice ale musculaturii membrelor, iar moartea survine în 3—10 zile. Autorii consideră că apariţia acestor fenomene se datoreşte elaborării unei endotoxine care se înrudeşte cu toxina difterică, dar care nu este neutralizată de antitoxina obişnuită. Atît endotoxina, cît şi exotoxina produc fenomene identice prin inocularea pe această cale, ambele fiind puternic neurotrope, cu singura deosebire că fenomenele produse de tulpinile toxigene sînt prevenite de administrarea prealabilă a antitoxinei. Faptul că endotoxina nu este neutralizată de antitoxină explică ineficienţa seroterapiei în unele cazuri clinice, considerate de Frobisher ca difterie endotoxică.

Efectul toxinei difterice este astăzi bine cunoscut, totuşi rezultatele experimentale sugerează existenţa unor deosebiri fundamentale în ceea ce priveşte infectivitatea în funcţie de calea de inoculare. Astfel, inocularea intraperitoneală la cobai este ceva mai puţin severă decît cea pe cale subcutanată sau aceea pe cale intramusculară ; simpla aplicare a culturilor de *C. dyphtheriae* puternic toxigene pe mucoase nu reproduce falsa membrană, dacă nu există concomitent o leziune minimă.

Murata și Akamo (1959) critică metoda inoculării pe cale parenterală și o consideră ca o tehnică convențională care nu poate furniza informații complete privind virulența tulpinii de *C. dyphtheriae* în situația ei naturală, unde microbul rămîne la periferia organismului, cantonat la poarta de intrare. În acest caz ei folosesc inocularea mucoasei conjunctivale, lezate în prealabil și stabilesc că severitatea simptomelor variază de la tulpină la tulpină, în sensul că tulpinile toxigene nu sînt toate la fel de virulente.

Calalb, Saragea și colaboratorii (1962), folosind experimental aceeași cale de inoculare conjunctivală, obțin diferențe în raport cu toxigeneza și data izolării tulpinii de *C. dyphtheriae* din organism.

Budinger și Henigest (1961) încercînd infecția experimentală pe ouă embrionate, obțin cu tulpinile toxigene inoculate pe membrana corioalantoidă a embrionilor de găină, în vîrstă de 9—14 zile, o pseudomembrană tipică, urmată de moartea embrionului.

Boala la om. În urma contaminării, *C. dyphtheriae* ajunge pe mucoasa faringiană și amigdaliană unde se fixează, alterează epiteliul și produce un exsudat fibrinos. Fibrina formează falsele membrane care, coborînd uneori în laringe, provoacă așa-numitul crup difteric. *C. dyphtheriae* rămîne cantonat la poarta de intrare și secretă o toxină difuzibilă, care se răspîndește în organism pe cale sanguină, limfatică sau nervoasă. Toxina are afinitate pentru anumite țesuturi (miocard, glande suprarenale, rinichi, musculatura netedă, sistem nervos), determinînd pe de o parte degenerescențe perenchimatoase grave (miocardite), iar pe de altă parte, polinevrita difterică și paraliziile postdifterice care interesează diferiți nervi cranieni și în special nervul oculomotor, perechile a IX-a și a X-a. Aceste complicații pot apărea pînă la a 6-a săptămînă de boală.

Se deosebesc 3 forme clinice ale toxiinfecției difterice:

1) forma obișnuită, cu toată simptomatologia caracterstică anginei difterice;

2) forma ușoară, frustă;

3) forma malignă, hipertoxică.

Forma cea mai frecventă este amigdalita sau angina difterică, apoi laringita și rinita difterică, ambele fiind cel mai des secundare unei amigdalite. Se întîlnește de asemenea, uneori, difteria plăgilor chirurgicale și, extrem de rar, difteria mucoasei vulvare la fetițe. Oricare ar fi localizarea, simptomele de intoxicație generală sînt aceleași. Leziunea locală caracteristică este falsa membrană, de întindere și grosime variabile, de culoare albă-cenușie sau galbenă-cenușie murdar, aderentă de țesuturile lezate. Două procese contribuie la formarea falsei membrane: o congestie vasculară intensă, cu diapedeză leucocitară și exsudare de fibrină, și, pe de altă parte, un proces de necroză. La suprafața acestei membrane se găsește o adevărată cultură pură de *C. dyphtheriae*, uneori însă în asociație cu floră din rino-faringe. În zona dintre falsa membrană și țesutul de care aderă se găsește aproape exclusiv *C. dyphtheriae*.

Fenomenele clinice locale și generale sînt în funcție de gradul de rezistență a bolnavului și de patogenitatea tulpinii de *C. dyphtheriae*.

Ca fenomene toxice generale, se notează : febra moderată 38—38°5 (febra mai ridicată este datorită în general infecţiilor asociate), nelinişte, delir, puls accelerat, mic, neregulat, paloare accentuată, dispnee, stare de colaps, hipotensiune, ameţeli, greaţă, vărsături, albuminurie şi semne de iritaţie renală. Formele hipertoxice sînt însoţite de un sindrom hemoragic. Mai tîrziu pot apărea paraze, paralizii locale şi periferice, precum şi polinevrite. Moartea este, în general, provocată de tulburări grave în inervaţia inimii sau de miocardită gravă precoce. În cazurile benigne de difterie, simptomele se limitează la o amigdalită eritematoasă sau pultacee; vindecarea spontană este, în acest caz, urmată uneori de paralizii tardive. În cazurile de difterie laringiană, obstacolul mecanic poate provoca fenomene grave de asfixie, care cer intervenţie chirurgicală (tubaj, traheotomie). Cînd infecţia este provocată de o tulpină foarte toxigenă sau care elaborează toxina foarte repede, boala se manifestă sub forma difteriei maligne hipertoxice, caracterizată prin fenomene de intoxicaţie generală gravă şi rapidă, cu simptome locale reduse : tulburări cardiace, hipotensiune precoce şi marcată, sindrom hemoragic, tulburări nervoase. Letalitatea în asemenea cazuri este ridicată (peste 50%), moartea putînd surveni în primele 48 de ore.

Bolnavii vindecaţi de difterie pot rămîne un timp purtători de *C. dyphtheriae*, formînd sursa principală de contaminare şi răspîndire a bolii.

Există numeroase date în literatură care citează cazuri de difterie la vaccinaţi. Acestea sînt totdeauna forme clinice uşoare, cu evoluţie benignă şi fără complicaţii, exprimînd o imunitate parţială sau în scădere.

Apariţia cazurilor de îmbolnăvire la vaccinaţi nu trebuie să pună la îndoială eficacitatea vaccinărilor antidifterice, deoarece majoritatea acestor cazuri sînt reprezentate de vaccinaţi incomplet sau de o vaccinare foarte îndepărtată sau dubioasă.

Imunitate. Difteria este prin esenţă o boală toxică şi cu toate că pot fi puse în discuţie şi alte elemente ca luînd parte la rezistenţa cîştigată în această boală, cel mai important factor rămîne exotoxina difterică. Toxina difterică este omogen antigenică, indiferent de tulpina de origine şi se pretează deosebit de bine la detoxifiere. Ea este neutralizată *in vitro* şi *in vivo* de antitoxina homologă. Dovada că toxina este elementul de bază în instalarea imunităţii antidifterice este faptul că vaccinarea cu anatoxină conferă rezistenţa specifică faţă de boală.

Rezistenţa în difterie poate fi dobîndită pe cale naturală, prin îmbolnăvire, sau în mod artificial pe cale activă prin vaccinare profilactică sau pe cale pasivă prin administrarea serului antitoxic antidifteric în tratamentul difteriei. Această cantitate mică de antitoxină circulantă uneori, în unele cazuri de boală cu tulpini puternic toxigene deşi ar putea fi insuficientă pentru a apăra de boală, reprezintă totuşi la persoanele activ imune, faţă de persoanele lipsite de imunitate, o rezistenţă specifică de bază care determină un răspuns rapid şi suficient cantitativ faţă de toxina eliberată din ţesuturile bolnave, încît poate echilibra imediat efectul toxic.

Rezistenţa solidă conferită de imunitatea antitoxică specifică determină neutralizarea şi blocarea toxinei, înainte ca ea să ajungă şi să se fixeze pe celulele sensibile. De îndată ce toxina s-a fixat pe celulele sensibile şi leziunea s-a produs, antitoxina nu mai este eficientă.

Existența indiscutabilă a unei imunități antidifterice antitoxice este pusă în evidență prin reacția Schick. Schick a folosit o cantitate de 1/50 DLM inoculată pe cale intradermică, în volum de 0,2 ml pentru a evidenția prezența sau absența antitoxinei circulante difterice. Cantitatea minimă de antitoxină circulantă capabilă de a neutraliza toxina inoculată capabilă să producă o reacție Schick-negativă este de 0,03 U.A. Unitatea antitoxică internațională definită de Ehrlich este cantitatea cea mai mică de antitoxină difterică capabilă de a neutraliza 100 DLM.

Dar probabil, în difterie nu există numai imunitate antitoxică, fenomenul fiind mult mai complex; pentru aceasta pledează următoarele constatări:

— imunitatea antitoxică nu este totdeauna suficientă pentru a evita îmbolnăvirea;

— unii indivizi, cu o concentrație relativ joasă de antitoxină sînt totuși rezistenți la infecția difterică.

În sprijinul acestor constatări ipotezele lui O'Meara și Niggemeyer sugerează că factorul de virulență elaborat de *C. dyphtheriae* în contact cu țesuturile, „hialuronidaza" (O'Meara) sau factorul de răspîndire „invazina" (Niggemeyer), produce în organismul persoanelor pe care le infectează antiinvazine care mențin infecția localizată. Prezenței acestui factor de răspîndire i se atribuie cazurile de difterie hipertoxică, care apar chiar în condițiile unui nivel de antitoxină suficient de ridicat.

În timp ce imunitatea antitoxică în difterie este bine stabilită și unanim recunoscută, existența unui factor antibacterian este o problemă încă discutată.

Observațiile că tulpini de *C. dyphtheriae* netoxigene pot fi izolate de la bolnavi și din ipotezele susținute de unii autori că tulpinile avirulente foarte răspîndite în natură joacă rolul unui factor imunizant natural au determinat o serie de experiențe pentru dovedirea unei imunități antibacteriene.

Frobisher, Parsons, Updyke (1947) semnalează prezența unei imunități antibacteriene. Imunizarea iepurilor cu tulpini netoxigene nu se însoțește de formare de antitoxină decelabilă și totuși animalele prezintă o oarecare rezistență specifică față de același tip serologic toxigen.

Lautrop (1955) confirmă această rezistență conferită de o tulpină netoxigenă față de infecție cu o tulpină virulentă serologic homologă, dar constată că vaccinul bacterian totuși nu apără contra unei doze letale de toxină difterică, iar protecția oferită de antigenele corpilor bacterieni se însoțește de un fenomen de sensibilizare.

Deși s-au făcut unele încercări de introducere a vaccinurilor bacteriene asociate cu anatoxina, totuși în practica profilactică nu s-a ajuns la concluzii definitive.

Tratamentul specific al difteriei. Difteria fiind o toxiinfecție, terapia specifică se bazează pe administrarea serului antitoxic în vederea neutralizării și prevenirii apariției leziunilor provocate de toxină. Serurile antitoxice antidifterice se prepară pe cai prin injecții repetate de anatoxină, iar titrurile minime utile sînt de 500—1 000 U.A./ml.

Activitatea specifică a serului se bazează pe combinarea cu o cantitate corespunzătoare de toxină pe care o neutralizează. Administrarea serului antidifteric nu conferă decît o imunitate trecătoare şi se foloseşte numai pentru protecţia bolnavilor.

O calitate specifică serurilor, în afară de titrul antitoxic, este „aviditatea". Kraus (1903) a arătat că seruri cu acelaşi conţinut în unităţi antitoxice nu neutralizează în acelaşi interval de timp o cantitate corespunzătoare de toxină pentru a o face inofensivă. Această concepţie presupune că un ser cu o putere de neutralizare rapidă va conferi şi o mai bună protecţie *in vivo*.

Cercetările lui O'Meara (1940) arată că aviditatea serurilor este conferită de obicei de componenta *B* a toxinei difterice.

Deoarece serul antitoxic antidifteric este preparat cu filtratul de cultură al tulpinii PW_8, toxigenă, dar considerată ca nevirulentă, el conţine o cantitate importantă de anticorpi faţă de componenta *A* a toxinei preponderente la această tulpină şi mai puţin faţă de componenta *B*, care este mai mult prezentă la tulpinile de tip *gravis*. Aceste fapte explică cazurile de boală refractare la terapia specifică; de asemenea, ele ridică problema că imunitatea nu depinde aşa de mult de cantitatea de antitoxină specifică faţă de toxina *A*, cît de calitatea ei şi anume faţă de toxina *B*. Aviditatea unui ser se poate exprima prin raportul *vivo-vitro*: *vivo*-titrul antitoxic determinat *in vivo* după Ehrlich; *vitro*-titrul determinat *in vitro* prin metoda floculăriii după Ramon. Acest raport pentru serurile avide este de 1 sau >1, în timp ce serurile neavide au un indice sub unitate.

În ceea ce priveşte măsurile terapeutice care trebuie luate, este important de reţinut că la bolnav administrarea serului trebuie făcută imediat după prima suspiciune a unei infecţii difterice. Diagnosticul clinic hotărăşte instituirea seroterapiei şi nu trebuie să se aştepte confirmarea diagnosticului clinic prin diagnosticul de laborator.

Cantitatea de ser administrată trebuie să fie în concordanţă cu cantitatea de toxină elaborată de *C. dyphtheriae*. În practica seroterapiei antidifterice, doza minimă este calculată între 500 şi 1 000 U.A./kilocorp şi administrată în doză mică. În cazurile de difterie hipertoxică sau tratament tardiv, se administrează 200 000 U.A. şi mai mult.

O dată cu administrarea de ser este absolut necesar să se consolideze imunitatea organismului printr-o vaccinare activă, atît antidifterică, cît şi faţă de alte boli care ar necesita o seroterapie sau seroprofilaxie. Astfel, după administrarea serului se începe vaccinarea activă cu anatoxină difterică şi tetanică, 3 inoculări a 0,5 ml la interval de 1 lună.

Aplicarea precoce şi judicioasă a seroterapiei antidifterice a determinat o scădere continuă a mortalităţii prin difterie. Folosirea serurilor antidifterice purificate şi concentrate înlătură în mare măsură principalul inconvenient al seroterapiei, accidentele anafilactice etc.

Diagnosticul de laborator în difterie se bazează pe izolarea agentului patogen din produsul patologic şi identificarea sa pe baza caracterelor morfologice de cultură, biochimice şi de patogenitate. Acest diagnostic situează tulpina izolată în cadrul genului *Corynebacterium*. Se efectuează apoi diagnosticul diferenţial cu speciiile de difterimorfi, iar în cadrul speciei *C. dyphtheriae* se stabileşte biotipul *gravis*, *mitis* sau *intermedius*. Există astăzi consens unanim că în prezenţa unor simptome clinice caracteristice de boală, chiar dacă în unele cazuri nu se izolează agentul etiologic, aceasta nu infirmă diagnosticul clinic, după cum nici prezența *C. dyphtheriae* într-un exsudat faringian nu indică diagnosticul de boală în lipsa fenomenelor clinice.

Se subliniază de asemenea că în caz de boală, din cauza imposibilității stabilirii unui diagnostic rapid de laborator, diagnosticul clinic este cel care hotărăște primele măsuri terapeutice, diagnosticul de laborator rămînînd să confirme diagnosticul clinic și să stabilească tipul biologic de *C. dyphtheriae* și capacitatea sa toxigenică. În ceea ce privește formele atipice de boală, diagnosticul de laborator ajută pe clinician contribuind la diferențierea unei angine difterice de alte angine.

Diagnosticul de laborator are o importanță deosebită din punct de vedere epidemiologic, întrucît prin stabilirea biotipului și lizotipului de *C. dyphtheriae* izolat de la bolnavi și purtătorii de microbi se pot studia aprofundat caracteristicele unui focar de difterie dintr-o colectivitate, se poate stabili filiația cazurilor și se pot institui măsuri științifice pentru combaterea și profilaxia difteriei.

Diagnosticul de laborator

Pentru realizarea diagnosticului de laborator se va ține seamă de:
- recoltarea produselor patologice;
- metodele izolării agentului etiologic din produsul patologic;
- metodele de identificare și stabilire a biotipului și lizotipului.

Recoltarea produselor patologice se face cu ajutorul unui tampon de vată steril. La bolnav cu difterie faringiană sau nazală se vor preleva secrețiile faringiene și nazale sau se va detașa sub control vizual o porțiune din falsa membrană.

În cazul oricărei alte forme de difterie se va preleva produsul patologic din leziune. Recoltarea la bolnav se va face totdeauna pe trei tampoane. La purtător, se va recolta în mod obligatoriu cîte un tampon din nas și din gît.

Precauții: recoltarea exsudatului faringian se va face de preferință dimineața pe nemîncate, evitîndu-se gargarele cu antiseptice înainte de recoltare și pe cît posibil înainte de orice tratament cu antibiotice sau seroterapie. În cazul cînd bolnavul a efectuat un tratament anterior, este necesar să se specifice laboratorului acest lucru, deoarece pot apărea forme de variație ale *C. dyphtheriae*. Însămînțarea se va face în cel mai scurt timp de la recoltare.

I. *Conduita examenului la bolnav* Cu tamponul 1 se vor efectua două frotiuri, care se fixează la flacără; unul se va colora prin procedeul Gram, iar celălalt pentru punerea în evidență a corpusculilor metacromatici Babeș-Ernst, cu una din tehnicile Neisser sau Del Vecchio.

Valoarea frotiului direct pentru diagnosticul difteriei este numai de orientare, deoarece există o mare asemănare a bacilului difteric cu bacilii difterimorfi; el poate da însă un diagnostic de orientare și mai ales stabilește diagnosticul diferențial cu infecția datorită asociației fuzo-spiralare (angina Plaut-Vincent).

Cu tamponul 2, se vor efectua însămînțări pe mediul Löffler și cîte o placă din mediile geloză-sînge, Gundel-Tietz și Clauberg (însămînţarea pe plăci se va face cu dispersie). Pentru a evita situaţia cînd însămînţările efectuate pe mediile de mai sus, după 24 de ore la 37°, nu au produs colonii suspecte de bacili difterici (infecţie paucibacilară), se efectuează :

Cu tamponul 3, o îmbogăţire, scufundînd tamponul în 2-3 ml mediu lichid de îmbogăţire O.C.S.T. (ou-cistină-ser-telurit); după incubare 12-18 ore la 37°, se va descărca tamponul scos din mediul de îmbogăţire pe aceleaşi medii ca mai sus, efectuînd dispersia pentru obţinere de colonii izolate.

La 24 de ore de la însămînţarea mediilor cu tamponul 2, acestea se cercetează pentru apariţia de colonii suspecte, care dacă există, se vor repica pe mediul Löffler şi bulion; dacă la o examinare minuţioasă nu există colonii suspecte de bacili difterici, se va efectua descărcarea tamponului 3 din mediul de îmbogăţire O.C.S.T.

La 24 de ore de la însămînţare se controlează aspectul de creştere a coloniilor pe geloză-sînge, Gundel-Tietz şi Clauberg şi se efectuează două frotiuri de pe Löffler colorate cu Gram şi pentru corpusculii Babeş-Ernst.

Aceste date sînt suficiente pentru un diagnostic de prezumţie. Pentru grăbirea diagnosticului, din coloniile izolate pe geloză-sînge, Löffler sau preferabil de pe mediul Gundel-Tietz se pot face însămînţări pentru : teste biochimice (zaharuri : glucoză şi zaharoză ; proba cistinazei ; proba ureazei), precum şi pentru testul de toxigeneză *in vitro* (Elek). Toate aceste date ne îngăduie un diagnostic ferm la 48 de ore, stabilind astfel diagnosticul de specie în cadrul genului *Corynebacterium* şi dacă este vorba de o tulpină toxigenă de *C. dyphtheriae*. În cadrul speciei *C. dyptheriae*, diagnosticul biotipului se va stabili ulterior.

Tulpina repicată pe mediul Löffler se controlează pentru morfologia microscopică şi puritate, apoi se identifică studiind următoarele caractere :

A. *Caracterele morfologice şi tinctoriale*. Se urmăreşte morfologia caracteristică pentru bacilul difteric, prin coloraţia Gram, frotiul fiind efectuat de pe mediul Löffler. Se cercetează de asemenea prezenţa corpusculilor metacromatici Babeş-Ernst, prin colorarea frotiului prin una din metodele Del Vecchio sau Neisser. Se atrage atenţia asupra aspectelor morfologice variate pe care le poate lua bacilul difteric în urma largii utilizări a antibioticelor, forme care variază de la bacili mari, măciucaţi, pînă la bacili de dimensiuni reduse, uneori forme cocoide. Diagnosticul diferenţial se face cu bacilii difterimorfi mai des întîlniţi, cu habitat uman :

— *C. hoffmanni* — bacili scurţi, monomorfi, cu capetele ascuţite (bob de orez), aşezaţi în palisadă, gram-pozitivi intens, rezistă la o decolorare prelungită. Nu prezintă corpusculi metacromatici ;

— *C. xerose* şi *C. cutis* — bacili cu morfologie foarte asemănătoare cu aceea a b. difteric, mai puţin pleomorfi, gram-pozitivi intens, prezintă corpusculi necaracteristici care dau un aspect barat sau tigrat.

B. *Caracterele morfologice de cultură* se vor studia pe medii solide : mediul Löffler, geloză-sînge, Gundel-Tietz şi Clauberg, pe care bacilul difteric produce colonii cu morfologie corespunzătoare tipului tulpinii pe care o reprezintă (*gravis*, *mitis* sau *intermedius*). Pentru diagnosticul diferenţial, se va ţine seamă că unii microbi din flora de asociaţie din rino-faringe se pot dezvolta şi ei pe aceste medii, prezentînd o morfologie oarecum apropiată. Astfel, pe mediul Löffler mediul de elecție, *C. dyphtheriae* se dezvoltă rapid, formînd colonii de culoare albicioasă și aspect cremos, ceea ce îl diferențiază de bacilii difterimorfi care dau colonii alb-cenușii, sau de unele corinebacterii atipice cu colonii pigmentate galben, de aspect rugos și aderente la mediu.

Pe geloză-sînge, în plăci Petri, coloniile de *C. dyphtheriae* apar albe cu nuanțe gri ca perla, cu suprafața ușor granulară, cu consistență friabilă. Ele se diferențiază net de consistența cremoasă umedă a unei colonii de bacili pseudodifterici pe același mediu. Geloza-sînge este un mediu valoros în diagnosticul de laborator în difterie, deoarece, pe lîngă că este ușor de realizat oferă posibilitatea de a obține ușor colonii izolate, care se dezvoltă rapid și se diferențiază bine de restul florei de asociație.

— Mediul Gundel-Tietz, deosebit de selectiv, oferă aspectul cel mai caracteristic pentru cele 3 tipuri : *gravis*, *mitis*, *intermedius*. Trebuie știut însă că pe acest mediu se dezvoltă și bacilii difterimorfi : *C. hoffmanni* cu colonii cenușii, cu centrul mai închis și periferia mai decolorată, care sugerează aspectul unui ochi, și *C. xerosis* cu colonii negre, lucioase. Din flora asociată se mai pot dezvolta enterococul, cu colonii mici plate, brun închis, unele tulpini de stafilococ cu colonii negre lucioase, bombate și unele ciuperci.

— Mediul Clauberg, foarte bun mediu selectiv și diferențial, permite diferențierea tulpinilor de *C. dyphtheriae* care produc colonii negre, cu luciu metalic și halou albastru, de *C. hoffmanni* cu colonii cenușii, fără halou, și *C. xerosis* cu colonii lucioase, cu halou care apare tardiv. Din flora asociată, pe acest mediu cresc : enterococul cu colonii negre, cu reflexe roșcate și halou albastru, stafilococul cu colonii negre lucioase mari, cu halou albastru intens și unele ciuperci.

În mediu lichid, creșterea este variabilă după specie și tip. În cadrul speciei *C. dyphtheriae*, creșterea este caracteristică pentru fiecare tip în parte, astfel :

— *C. dyphtheriae*, tip *gravis*, bulion limpede cu peliculă ;

— *C. dyphtheriae*, tip *mitis*, bulion tulbure uniform ;

— *C. dyphtheriae*, tip *intermedius*, bulion ușor tulbure, tendință la inel.

Aspectul de creștere în mediul lichid al celorlalte corinebacterii nu este la fel de bine conturat (bulion ușor tulbure sau ușor tulbure cu depozit), astfel încît nu poate constitui un criteriu sigur de diagnostic. Aspectul de creștere în bulion rămîne deci să fie utilizat numai drept criteriu de stabilire a biotipului în cadrul speciei *C. dyphtheriae*.

C. *Caractere biochimice.* Ele ajută atît la stabilirea diagnosticului de specie în cadrul genului *Corynebacterium*, cît și la stabilirea biotipului în cadrul speciei *C. dyphtheriae*, astfel :

1. Proba cistinazei (Pisu), probă de mare valoare pentru diagnosticul de laborator în difterie, este pozitivă în mod exclusiv pentru specia *C. dyphtheriae*. Aceasta, pe lîngă faptul că pune în evidență producerea de cistinază, atît de caracteristică pentru specia *C. dyphtheriae*, dovedește în plus caracterul de microaerofilie al tulpinii. Principiul metodei se bazează pe capacitatea speciei *C. dyphtheriae* de a hidroliza cistina cu eliberare de H_2S și pe calitatea acestuia de a se înnegri în prezența acetatului de Pb prin producere de subacetat de Pb. Tehnica folosește însă-

mînțarea prin înțepătură a culturii de testat de pe mediul Löffler, în mediul repartizat în coloană dreaptă. Proba este pozitivă pentru *C. dyphtheriae* și se apreciază după gradul de înnegrire care apare pe linia de însămînțare, cu apariția la interval de 24 de ore a unui halou cafeniu intens. Dezvoltarea culturii pe traseul înțepăturii dovedește caracterul de microaerofilie, caracteristic speciei *C. dyphtheriae.*

Proba este negativă pentru difterimorfi : *C. hoffmanni* se dezvoltă la suprafață, sub forma unei culturi albe, iar *C. xerosis* și *C. cutis* produc o înnegrire ușoară uneori la suprafață, fără a crește în condiții de microaerofilie. Proba este de asemenea negativă pentru corinebacteriile atipice.

2. Spectrul de fermentare a zaharurilor se practică pe mediul Hiss, cu indicator Andrade, la care se adaugă următoarele zaharuri : glucoză, zaharoză, manită, maltoză și levuloză pentru diagnosticul speciei și dextrină, amidon și glicogen pentru stabilirea biotipului în cadrul speciei *C. dyphtheriae.*

Caracteristic pentru *C. dyphtheriae* este fermentarea glucozei, maltozei și levulozei și nefermentarea zaharozei și manitei. Celelalte specii din cadrul genului *Corynebacterium* se comportă astfel :

— *C. xerosis* fermentează glucoza, zaharoza, maltoza, levuloza și nu fermentează manita ;

— *C. cutis commune* fermentează glucoza, zaharoza, levuloza și nu fermentează manita și maltoza ;

— *C. hoffmanni* nu fermentează nici un zahar.

Tabelul LV

Spectrul de fermentare a zaharurilor la specia *C. dyphteriae* comparativ cu speciile de difterimorfi cu habitat uman

Specia	Glucoză	Zaharoză	Manită	Maltoză	Levuloză	Dextrină	Amidon	Glicogen
C. dyphtheriae gravis	+	—	—	+	+	+	+	+
C. dyphtheriae mitis	+	—	—	+	+	—	—	—
C. dyphtheriae intermedius	+	—	—	+	+	+	—	—
C. hoffmanni	—	—	—	—	—	—	—	—
C. xerosis	+	+	—	+	—	—	—	—
C. cutis commune	+	+	—	—	+	—	—	—

Din cele de mai sus reiese că în ultimă instanță, pentru diagnosticul de specie pentru *C. dyphtheriae*, este esențială cercetarea fermentării glucozei și zaharozei.

Comportarea diferită față de polizaharizi determină, în cadrul speciei, biotipul de *C. dyphtheriae* :

— *C. dyphtheriae gravis* fermentează dextrina, amidonul și glicogenul ;

— *C. dyphtheriae mitis* nu fermentează nici un polizaharid ;

— *C. dyphtheriae intermedius* fermentează inconstant dextrina și nu fermentează amidonul și glicogenul.

3. Proba ureazei (Pueschel), deși de mai mică valoare, este totuși necesară pentru diferențierea cu B. difterimorfi. Proba se bazează pe

proprietatea B. difterimorfi de a scinda ureea cu producere de amoniac, datorită ureazei pe care o elaborează. Punerea în evidență a ureazei se face pe mediul Blake-Kristensen, recomandat de Kauffmann pentru salmonele. *C. dyphtheriae* nu elaborează urează. Reacția este pozitivă pentru majoritatea tulpinilor de *C. hoffmanni* și pentru o parte din tulpinile de *C. xerosis* și *C. cutis*.

4. Proba fosfatazei (Bray și King), facultativă, pune în evidență capacitatea unor tulpini de B. difterimorfi de a elabora fosfatază. Mediul recomandat de Gostaldi folosește un substrat de proteine coagulate cu difuziune redusă (mediul Dorset), în care se încorporează substanțele care intră în reacție: fenolfatlein-fosfatul de Na, de Ca sau colaminfenolftaleinfosfat. Fosfataza elaborată de majoritatea B. difterimorfi eliberează radicalul fosforic din sarea de Na, Ca sau colamin, punînd în libertate fenolftaleina. Reacția se citește expunînd cultura de 24 de ore la vapori de amoniac. În mediul alcalin astfel creat, în cazul unei reacții pozitive se produce o înroșire a culturii, care variază ca intensitate de la tulpină la tulpină.

C. dyphtheriae nu elaborează fosfatază. Proba este pozitivă pentru majoritatea tulpinilor de *C. xerosis* și *C. cutis* (90%) și o parte din *C. hoffmanni* (60%).

5. Testul hemolizei (Hewitt). Se cercetează față de o suspensie de hematii de iepure și contribuie la stabilirea diagnosticului de tip în cadrul speciei *C. dyptheriae*; reacția prezintă următorul aspect:

— tipul *gravis*, hemoliză parțială sau absența hemolizei;
— tipul *mitis*, hemoliză intensă;
— tipul *intermedius* nu lizează niciodată hematiile de iepure.

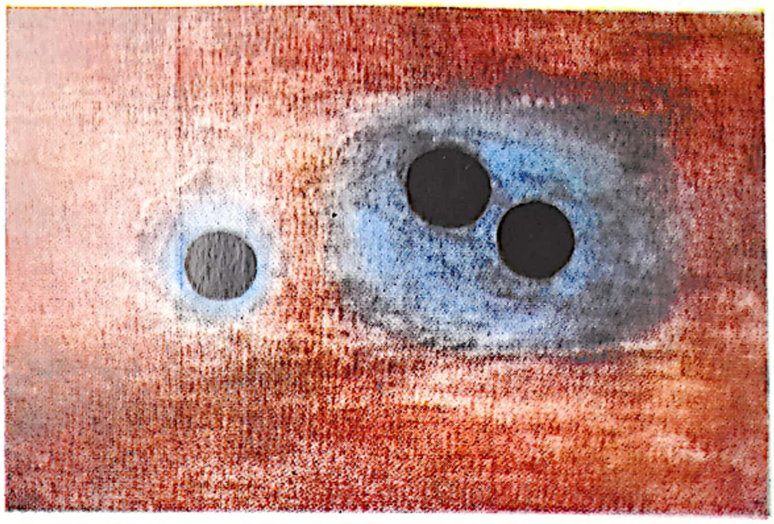
6. Cercetarea testelor de patogenitate este obligatorie în studiul unei tulpini de *C. dyphtheriae*. Necesitatea acestui test se impune nu numai pentru interesul pe care-l prezintă în identificarea unei tulpini de *C. dyphtheriae*, dar și pentru profilarea perspectivelor epidemiologice, cunoscut fiind faptul că în prezența unei tulpini toxigene care de obicei este dotată cu o capacitate mare de invazie în focar și măsurile ce vor fi luate trebuie să fie urgente și severe.

Capacitatea toxigenică a unei tulpini de *C. dyphtheriae* se poate cerceta prin metoda *in vivo* și metoda *in vitro*. Metodele *in vivo* se practică fie prin testul subcutanat la cobai sau pe cale intradermică atît la iepure (Fraser), cît și la cobai. Metoda *in vitro* folosește testul de precipitare în gel, după Elek-Ouchterlony-Frobisher. Acest test, foarte precis, corespunde 100% testelor *in vivo* pe cobai și iepure. În general, pentru condițiile laboratoarelor de teren, acest test este deosebit de util, sensibil, economic și ușor de realizat.

II. *Conduita examenului la purtătorul de bacili difterici.* Pe cele două tampoane recoltate în mod obligatoriu din nas și gît se efectuează o îmbogățire de 24 de ore în mediul O.C.S.T. Dacă recoltele sînt foarte numeroase și posibilitățile tehnice nu permit uneori descărcarea pe mediile solide după acest interval, tampoanele se pot menține 36—48 de ore în mediul de îmbogățire fără nici un inconvenient.

La 24 de ore se efectuează descărcarea tampoanelor pe mediul Gundel-Tietz (nas și gît pe aceeași placă) și facultativ pe geloză-sînge;

Fig. 110 — *C. diphtheriae* — colonii pe mediul Clauberg.



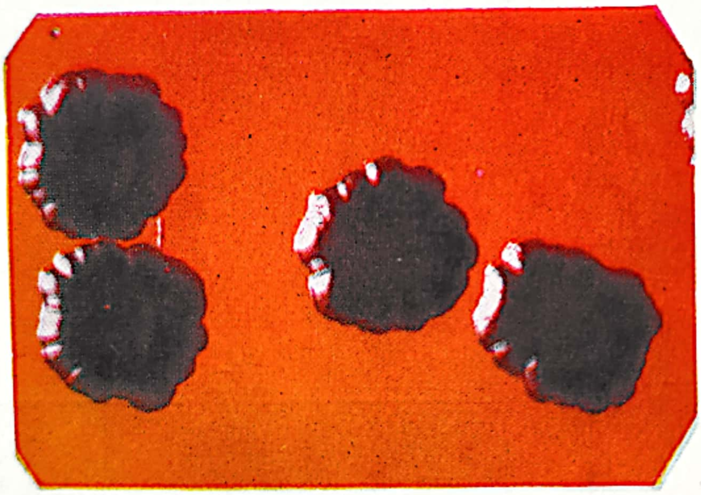


Fig. 111. — *C. diphtheriae* tip *gravis* — colonii pe mediul Gundel-Tietz.

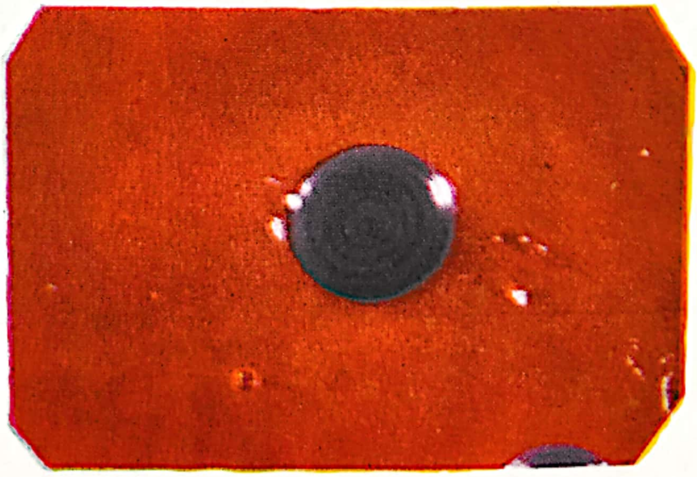


Fig. 112. — *C. diphtheriae*: colonii tip intermedius.

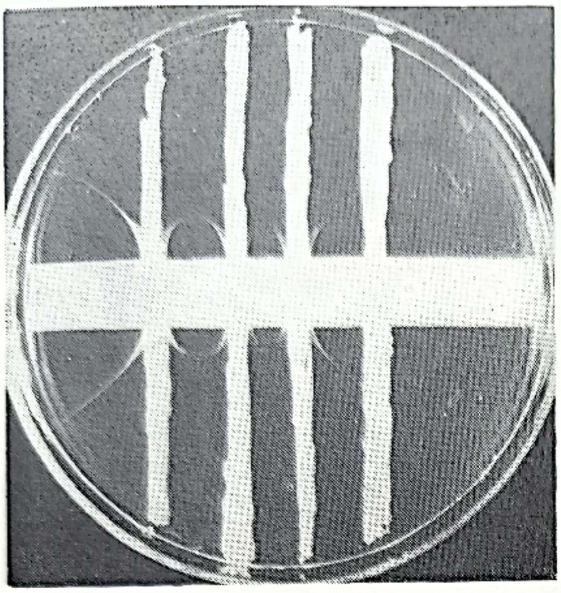


Fig. 113. — Testul de precipitare în gel (Elek-Ouchterlony-Frobisher) pentru evidenţierea toxigenezei *in vitro*;

a — tulpină netoxigenă; *b* şi *c* — tulpini intens toxigene.

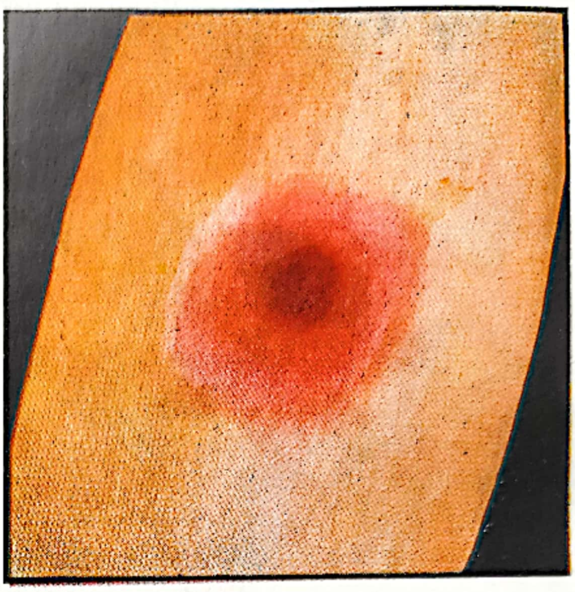


Fig. 114. — Testul cutanat Schick — reacţie simplă, eritematoasă.

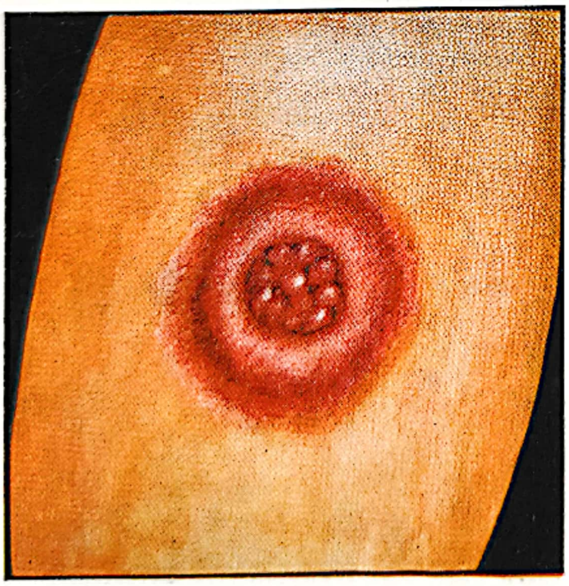


Fig. 115. — Testul cutanat Schick — reacţie în cocardă.

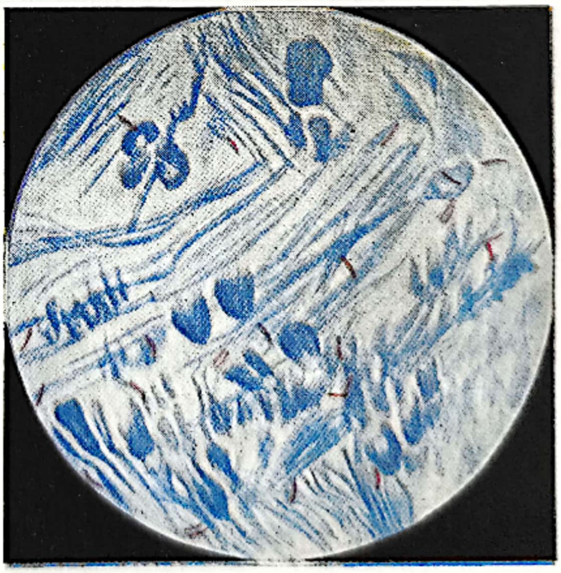


Fig. 116. — *M. tuberculosis* într-un produs patologic (spută).

după încă 24 de ore, se fac treceri pe mediul Löffler a coloniilor suspecte a fi *C. dyphtheriae* care de obicei, după îmbogățirea efectuată, se dezvoltă rapid și luxuriant.

Cultura obținută pe mediul Löffler se identifică pe baza:

— caracterelor morfologice (colorație Gram și corpusculi);
— caracterelor de cultură pe mediul Clauberg;
— caracterelor biochimice: a) fermentarea zaharurilor (glucoză și zaharoză pentru diagnostic de specie; dextrină, amidon și glicogen pentru diagnosticul de tip); b) proba cistinazei;
— caracterelor de patogenitate: toxigeneza *in vitro* (testul Elek).

Pe baza acestor probe restrînse, dar esențiale, se poate pune un diagnostic de specie și de biotip, în cadrul speciei, care va indica investigațiilor epidemiologice conduita de urmat.

În completarea diagnosticului se va efectua pentru tulpina de *C. dyphtheriae* izolată de la purtător, o determinare a spectrului de sensibilitate la antibiotice, dintre care nu vor lipsi cloramfenicolul, eritromicina, polimixina și tetraciclinele și se vor da indicații asupra antibioticului de elecție în vederea sterilizării purtătorului.

Cercetarea prin metoda lizotipiei a lizotipurilor de *C. dyphtheriae* în cadrul unui focar de difterie constituie singura metodă științifică de investigație epidemiologică, pentru stabilirea cu precizie a izvorului de infecție și a filiației cazurilor într-o colectivitate. Faptul că există o strictă specificitate și o netă stabilitate a lizotipurilor la bolnavi și purtător într-un focar de difterie, conferă metodei o valoare deosebită, care va permite în viitorul apropiat cunoașterea aprofundată a epidemiologiei difteriei.

Schema originală de lizotipie elaborată de A. Saragea, constituită din 24 de preparate fagice, care subdivide tipurile de bacili difterici în 19 lizotipuri, permite cunoașterea distribuției geografice a lizotipurilor de *C. dyphtheriae*, ceea ce constituie o premisă științifică prețioasă pentru măsurile de eradicare a difteriei.

În diagnosticul de laborator al difteriei este necesar să se țină seama de existența tulpinilor „atipice” de corinebacterii. Acestea apar în fostele focare de difterie, la purtătorii de tulpini toxigene după administrare de antibiotice sau după vaccinare și deci trebuie considerate ca *C. dyphtheriae* modificate. Din studiul acestor tulpini putem reține ca elemente esențiale pentru diagnostic următoarele caractere: pe mediile solide, creștere „rough” cu elaborare de pigment galben; în mediul lichid, bulionul rămîne limpede cu o peliculă groasă la suprafață (creștere strict aerobă); proba cistinazei și ureazei, negative; proba fosfatazei pozitivă; spectru atipic de fermentare a zaharurilor; uneori fermentație tip *mitis*, alteori *xerosis*, alteori absența fermentației sau numai fermentația glicogenului. Toxinogeneza *in vitro* și *in vivo* este negativă.

Medii de cultură și tehnici de lucru folosite în cadrul diagnosticului de laborator

1. Tehnica colorării frotiurilor pentru prezența corpusculilor metacromatici:

Colorația Neisser:

Soluția I —	albastru de metilen	0,1 g
	alcool etilic 95°	2 ml

	acid acetic glacial	5 ml
	apă distilată	100 ml
Soluția II —	cristal violet	1 g
	alcool etilic 95°	10 ml
	apă distilată	300 ml

Colorantul Neisser se realizează amestecînd extemporaneu 2 părți soluția I și 1 parte soluția II. Metoda de colorație comportă următorii timpi:

— colorant Neisser	1 minut
— soluția Lugol	1 minut
— spălare cu apă	
— colorație suplimentară cu crisoidină 1/300 sau vezuvină 1/500;	
— spălare cu apă.	

Colorația Del Vecchio. Se folosește albastru de metilen alcalin (albastru Löffler) preparat astfel: din soluția alcoolică de albastru de metilen 10%, maturată o săptămînă la termostat (soluție mamă) se realizează o soluție apoasă 10%, la care se adaugă hidrat de K 0,1‰. Se menține o săptămînă la termostat la 37°, după care se filtrează. Soluția de albastru de metilen, prin învechire, capătă proprietăți de metacromazie.

Tehnica de colorare:

— albastru de metilen Löffler	10 minute
— spălare cu apă de robinet	
— soluția Lugol	10 minute
— spălare cu apă de robinet.	

Corpusculii apar colorați în brun-verzui, iar corpul bacilului în galben.

2. Tehnica de preparare a mediului Löffler: la 100 ml bulion glucozat 1%, pH 7,6, se adaugă în mod steril 300 ml ser normal de bou.

După amestec, se repartizează cu precauții de sterilitate aproximativ 5—6 ml în tuburi sterile; se coagulează la baie de nisip la 90°, timp de 1 1/2 oră, în poziție înclinată. Se controlează pentru sterilitate, 24 de ore la termostat. Adaosul de cistină în proporție de 0,1 ml din soluția 1% la 100 ml mediu îmbunătățește mult calitățile acestui mediu de elecție pentru *C. dyphtheriae*.

3. Tehnica de preparare a mediului Gundel-Tietz: la 100 ml geloză obișnuită 2—2,5%, cu pH 7,4 (topită și răcită la 40—45°), se adaugă în mod steril:

10 ml sînge defibrinat de iepure, oaie sau cal;
4 ml telurit de K, soluție 1%;
0,1 ml cistină, soluție 1%.

a) Sîngele de iepure, oaie sau cal se recoltează în mod steril și se defibrinează prin agitare pe perle de sticlă. Se poate păstra 2—3 zile la ghețar;

b) soluția de telurit de K 1%: dacă teluritul nu se dizolvă direct din prima intenție, și nici după o ușoară încălzire a apei distilate, se încearcă să se topească cît se poate în 4/5 din volumul total de apă distilată; se lasă 24 de ore să se depună partea nedizolvată și se decantează în alt balon lichidul supernatant. Depozitul rămas se tratează cu o soluție 1% de hidrat de K, picătură cu picătură, pînă la clarificare. Se neutralizează adăugînd picătură cu picătură HCl soluție 10%; după fiecare picătură se formează un precipitat alb care se redizolvă prin agitare; cînd s-a ajuns la neutralizare, dacă se mai adaugă o picătură de HCl, tot lichidul devine opalescent. Nu trebuie trecută această limită. Se adaugă decantatul peste această fracțiune și se completează cu apă distilată, la volumul necesar. Se sterilizează 20 de minute la 105°;

c) soluția de cistină 1%: se dizolvă 1 g carbonat de sodiu anhidru în 10 ml apă distilată. Se încălzește la fierbere, apoi se adaugă 1 g cistină (l-cistină sau preferabil dl-cistină). Se încălzește din nou agitîndu-se; se adaugă 90 ml apă distilată. Soluția astfel obținută trebuie să fie de culoare galben-palid. Se sterilizează 20 de minute la 105° și se păstrează la ghețar, în flacon de culoare închisă, la adăpost de lumină. Dacă soluția, prin învechire, își modifică culoarea, nu se va mai folosi.

4. Tehnica de preparare a mediului Clauberg. Pentru prepararea acestui mediu se folosesc următoarele soluții, care se pot păstra ca atare la ghețar și care se amestecă în mod steril în momentul preparării mediului. Mediul o dată preparat, se poate păstra maximum 7—8 zile la ghețar.

a) Soluție-mamă de Wasserblau 1,75% (Standardisiertes Wasserblau 6 B, extra P, Grübler, Leipzig); se dizolvă în apă distilată rece. Nu este nevoie de filtrare, soluția obținută este limpede. Se sterilizează 20 de minute la 105°. Se păstrează la temperatura camerei sau gheţar.

b) Soluţie-mamă de acetat de sodiu 25%: se dizolvă 25 g acetat de sodiu în 50 ml apă distilată rece, apoi se completează la 100 ml. Se sterilizează timp de 20 de minute la 105°. Se păstrează la temperatura camerei sau gheţar.

c) Soluţie de cistină 1%: modul de preparare ca la mediul Gundel-Tietz.

d) Soluţie de glucoză: se calculează cantitatea de glucoză necesară pentru a avea în mediu o concentraţie de 1,5 g%. Practic, se face o soluţie de glucoză 50% în apă distilată. Sterilizare 20 de minute la 105°. Din această soluţie se adaugă 1,5 ml la 50 ml mediu final.

e) Geloză 4%, cu următoarea compoziţie:

Macerat de carne	1 000 ml
Peptonă	10 g
NaCl	3 g
Fosfat disodic	2 g
Geloză fibre	40 g
pH 7,4—7,5	

Se filtrează 20 de minute la 120°; se filtrează prin vată sau decantare. Se repartizează în flacoane sterile cîte 42 ml sau un multiplu de 42 ml. Se sterilizează 20 de minute la 110°. Se păstrează la gheţar pînă în momentul întrebuinţării.

f) Amestec de bază, cu următoarea compoziţie:

1) — 100 părţi sînge hidratat
2) — 5 părţi sînge glicerinat
3) — 8 părţi soluţie 1% selenit de potasiu

1) Sîngele de berbec, recoltat steril şi defibrinat, se amestecă o parte sînge cu două părţi apă distilată sterilă. Se poate recolta sîngele şi direct peste apă, cu condiţia de a agita continuu baloanele pentru a nu se produce cheaguri. Se foloseşte imediat.

2) Se amestecă în mod steril: două părţi sînge de berbec cu o parte glicerină bidistilată neutră sterilă (20 de minute la 105°). Acest produs se păstrează la gheţar şi în momentul întrebuinţării trebuie să aibă cel puţin 6 săptămîni vechime. Cu cît amestecul este mai vechi, cu atît este mai bun.

3) Soluţia de telurit de K se prepară ca la mediul Gundel-Tietz.

Amestecul de bază se poate păstra la gheţar timp de 1—1 1/2 lună. Nu se foloseşte dacă în loc să aibă la agitare o spumă de culoare roşie-bordeaux, îşi modifică culoarea spre brun.

Prepararea mediului: se repartizează în mod steril, în 3 baloane, următoarele elemente, care se menţin la baie de apă la temperatura de 45—48° pînă în momentul amestecului:

a) 42 ml geloză 4% topită şi răcită la 42°;
b) 50 ml amestec de bază, încălzit la 42°;
c) următoarele elemente în amestec:

— Wasserblau soluţie 1,75%	6 ml
Cistină soluţie 1%	1,25 ml
Acetat de sodiu soluţie 25%	0,6 ml
Glucoză soluţie 50%	3 ml

Se amestecă totul, turnînd (a) peste (c) şi totul peste (b). Se agită bine, evitînd formarea de spumă, şi se toarnă în strat subţire în plăci Petri. Mediul trebuie să aibă o culoare roşie închisă. În caz că mediul prezintă o culoare cu nuanţă spre verde, se pot adăuga cîteva picături dintr-o soluţie slabă de NaOH, sterilă. Plăcile turnate se pot menţine la gheţar 7—8 zile.

5. Tehnica de preparare a mediului de îmbogăţire O.C.S.T. (ou-cistină-ser-telurit, după Calalb, Saragea şi colaboratorii).

Compoziţie:

ser normal de bou	150 ml
bulion glucozat 2‰	50 ml
telurit de K sol. 2%	20 ml
cistină soluţie 1%	2,2 ml
2 gălbenuşuri de ou	

Tehnica de preparare: se aleg ouă proaspete; se spală bine cu apă şi săpun şi se menţin 1/2 oră în alcool 70°; după ce ouăle au fost astfel pregătite, se procedează la deschiderea lor: fiecare ou, fixat pe un suport, se şterge cu un tampon cu tinctură de iod, apoi cu o foarfecă şi o pensă sterilă se ridică un capac croit în cochilie. Se scurge albuşul, iar gălbenuşul se recoltează într-o sticluţă cu perle, prevăzută cu o pîlnioară, totul pregătit steril. În aceeaşi sticluţă se pot recolta 2 gălbenuşuri.

Se recomandă ca recoltarea ouălor să se facă cu o zi înainte de prepararea mediului, pentru ca să se efectueze în prealabil o probă de sterilitate din gălbenuşurile recoltate, prin însămînţarea unui ml gălbenuş într-un tub cu bulion. După 24 de ore de control, dacă proba de sterilitate este satisfăcătoare, se face amestecul ouălor cu restul mediului în cantităţile de mai sus. Mediul final se va controla pentru sterilitate prin însămînţarea a 1–2 ml pe medii obişnuite (geloză înclinată, bulion glucozat, geloză-sînge); teluritul din mediu poate da pe geloză-sînge o hemoliză care nu trebuie confundată cu cea produsă de germenii de suprainfecţie.

Mediul astfel preparat se păstrează într-un balon la gheţar pînă în momentul folosirii, cînd se repartizează cîte 3–5 ml în tuburile în care se află tamponul cu produsul recoltat.

6. Tehnica de preparare a mediului Hiss cu indicator Andrade, pentru spectrul de fermentaţie a zaharurilor.

Prepararea mediului Hiss: se dizolvă 7 g peptonă şi 1,4 g fosfat disodic în 1 400 ml apă distilată. Se ajustează la pH 7,8 cu NaOH soluţie 10%; se fierbe; se filtrează prin hîrtie de filtru; se sterilizează 20 de minute la 120°; se adaugă în mod steril 250 ml ser normal de bou. Se menţine 20 de minute la autoclav, la vapori fluenţi, după care se adaugă 11 ml din soluţia sterilă de indicator Andrade. La mediul final se adaugă soluţiile sterile de zaharuri, pentru a realiza o concentraţie finală de 0,4% pentru amidon şi 1% pentru glucoză, zaharoză, manită, maltoză, levuloză, dextrină şi glicogen.

Se procedează astfel: la 90 ml mediu final, se adaugă în mod steril 10 ml din soluţia de zaharuri 10% şi apoi, cu ajutorul unei pîlnii montată steril, se repartizează cîte 2 — 3 ml în tuburi mici. Pentru fiecare zahar în parte se va proceda la fel. Mediul repartizat în tuburi se controlează pentru sterilitate timp de 24 de ore la termostat.

Prepararea indicatorului Andrade: se dizolvă în 100 ml apă distilată: 0,5 g fucsină acidă şi 16 ml soluţie normală NaOH. Fucsina se decolorează. Soluţia se sterilizează 30 de minute la 115° şi se păstrează apoi la rece.

7. Tehnica Pisu pentru evidenţierea cistinazei. Mediul folosit: la 90 ml geloză 1,5 — 2%, cu pH 7,4 (topită şi răcită la 40 — 45°), se adaugă în mod steril:

10 ml ser normal de bou
2 ml cistină soluţie 1%
1 ml acetat de Pb soluţie 10%.

Se repartizează cîte 3–4 ml mediu în tuburi de hemoliză, lăsînd să se solidifice în coloană dreaptă. Însămînţarea se efectuează prin înţepătură cu ansa din cultura de 24 de ore pe mediu Löffler. Cultura se dezvoltă pe tot traseul însămînţat, producînd după 24 de ore un halou brun-cafeniu. Această probă este deosebit de utilă pentru diagnosticul de specie: dat fiind însă că unele substanţe care intră în compoziţia mediului se pot degrada prin învechire, se recomandă testarea fiecărui lot de mediu faţă de o tulpină cunoscută, martor pozitiv.

8. Tehnica Pueschel pentru evidenţierea ureazei. Se foloseşte mediul Blake-Kristensen cu următoarea formulă:

Bacto-peptonă-Difco	1 g
NaCl p.a.	5 g
KH_2PO_4	2 g
Roşu fenol soluţie 1/500	6 ml
Apă distilată	900 ml

Se dizolvă ingredientele la fierbere. Se ajustează la pH 6,8 — 6,9; se autoclavează la 120°, timp de 20 de minute. Se adaugă în mod steril 1 g glucoză (sub formă de soluţie sterilizată) şi 20 ml uree din soluţia 20%, filtrată în prealabil prin filtru Seitz. Mediul se prezintă ca un lichid galben clar; se repartizează în mod steril cîte 2 ml în tuburi mici; se controlează 24 de ore la termostat, pentru sterilitate. Reacţia se efectuează prin însămînţarea unei anse dintr-o cultură de 24 de ore pe Löffler; incubare 24 de ore. Reacţia pozitivă, care exprimă scindarea moleculei de uree cu eliberare de amoniac, se traduce prin înroşirea mediului. Proba este negativă pentru *C. dyphtheriae*, care nu posedă urează şi lasă mediul neschimbat.

9. Tehnica pentru evidenţierea fosfatazei (Bray şi King), modificată de Gostaldi. Mediul folosit: la 100 ml mediu Dorset se adaugă, în mod steril, 4 ml soluţie 1% fenolftaleinfosfat de Na, de Ca, sau colaminfenolftaleinfosfat. (Această soluţie se obţine prin dizolvarea substanţei în cantitatea corespunzătoare de apă bidistilată sterilă). Se omogenizează totul într-un balon cu perle şi se repartizează în mod steril în plăci Petri. Mediul se coagulează la baie de nisip, la 90°. Pe fiecare placă se pot însămînţa un număr destul de mare de tulpini, fie prin striuri radiare fie în spoturi. După incubare 24 de ore la 37°, se expune su-

prafaţa însămînţată la vapori de amoniac cîteva secunde. Vaporii alcalini produc înroşirea mediului mai mult sau mai puţin puternică, după gradul de scindare a radicalului fosforic şi eliberarea fenolftaleinei. Intensitatea reacţiei variază de la tulpină la tulpină şi se notează cu +, ++, +++. Tulpinile fosfatazo-negative nu produc nici o modificare de culoare. *C. dyphtheriae* nu produce fosfatază.

10. Tehnica Hewitt pentru evidenţierea hemolizei în mediu lichid. Tehnica de lucru: la 1 ml cultură de 24 de ore în bulion se adaugă 0,5 ml apă fiziologică şi 0,5 ml hematii de iepure 5% în apă fiziologică (spălate şi readuse la volum). Incubare 1 oră la 37°. Citire la 4–48 de ore. Testul este pozitiv pentru tulpinile de *C. dyphtheriae mitis* şi pentru unele tulpini *gravis*. Este negativ pentru tipul *intermedius*.

11. Tehnica testelor de patogenitate *in vivo*. *a*) Proba subcutanată la cobai: se inoculează pe cale subcutanată, în regiunea abdominală, la 2 cobai (de circa 250 g), dintre care unul imunizat pasiv, cîte 2 ml din cultura de 24 de ore în bulion a tulpinii de testat. Imunizarea cobaiului martor se face prin administrarea pe cale subcutanată sau intraperitoneală, cu 2 ore înainte de inocularea culturii, a 1 000 U.A. (circa 2 ml ser antidifteric). Cobaii sînt ţinuţi sub observaţie de la 24 de ore pînă la 30 de zile. Moartea cobaiului test cu fenomene specifice de intoxicaţie difterică: edem gelatinos la locul de inoculare, congestia capsulelor suprarenale, lichid seros în pleură, pericard şi peritoneu. În absenţa acestor fenomene la cobaiul martor, sînt considerate specifice pentru *C. dyphtheriae*. Dacă tulpina este slab toxigenă (cantitatea de toxină elaborată este sub o doză minimă mortală), cobaiul poate face o leziune locală, tradusă prin escară, sau o intoxicaţie cronică care se manifestă prin pierdere progresivă în greutate, caşexie şi paralizii, care survin la 15 – 20 de zile de la inoculare şi care în urmă duc la moartea animalului test.

Trebuie ţinut seama că paraliziile tardive pot fi datorite nu numai intoxicaţie cu cantităţi mici de toxină difterică, dar pot apărea ca simptom şi în alte afecţiuni patologice ale cobailor şi anume în meningoencefalomielita proliferativă (Römer) sau avitaminozele A şi E. În aceste cazuri, precizarea diagnosticului nu se poate face decît prin examene histopatologice care trebuie să intereseze toate organele şi în special sistemul nervos central şi glandele endocrine.

Lipsa fenomenelor patologice la cobaiul martor (imunizat) confirmă leziunile observate la cobaiul test ca fiind datorite intoxicaţiei difterice.

b) Proba intradermică la iepure — testul Fraser. Se inoculează pe cale intradermică, pe jumătatea dreaptă a spinării unui iepure depilat, 0,1 ml dintr-o cultură de 24 de ore în bulion a germenului de cercetat. În lipsa unei culturi în bulion, se poate efectua o suspensie de germeni în bulion dintr-o cultură de 24 de ore de pe mediul Löffler. Pe un iepure se pot testa deodată 15 — 20 de tulpini. După 3 1/2 — 4 ore de la inoculare, se injectează pe cale intravenoasă (în vena marginală a urechii) 2 000 U.A. ser antidifteric. După 10 minute de la administrarea serului, se inoculează pe jumătatea stîngă a spatelui aceleaşi suspensii din tulpinile de cercetat, în aceleaşi condiţii ca mai sus. O dată cu inocularea tulpinilor de cercetat se inoculează şi o tulpină de colecţie sigur toxigenă (martor), care testează reactivitatea iepurelui. Reacţiile se citesc comparativ după 24 — 48 de ore şi la 4 zile, începînd cu tulpina martor. Se consideră reacţii pozitive cele care se manifestă prin eritem, infiltrat, necroză şi escară. Aceste leziuni sînt considerate specifice, dacă pe jumătatea stîngă a spatelui, unde au fost inoculate aceleaşi tulpini, după administrarea de antitoxină difterică reacţiile sînt absente. Tulpina martor trebuie să prezinte reacţie specifică.

c) Proba intradermică la cobai. Se procedează asemănător ca la iepure, cu deosebirea că suspensia din cultura de testat se inoculează în cantitate de 0,2 ml, iar serul antidifteric reprezentat de 1 000 U.A. este introdus pe cale intraperitoneală. Se utilizează de preferinţă cobai albi. Pe un cobai de 400 — 500 g se pot testa în simultan 8 — 10 tulpini.

Tehnica de depilare a animalelor: se tunde părul cu foarfeca şi se aplică o pastă făcută din amestec depilator cu puţină apă. Se lasă un minut, apoi se şterge cu un tampon umezit în apă caldă. Se unge apoi pielea cu glicerină şi se lasă animalul în repaus pînă a doua zi, cînd poate fi inoculat.

Amestec depilator:		
	sulfură de Ba	50 g
	oxid de zinc	35 g
	amidon	60 g

Amestecul se păstrează într-un borcan închis, la loc uscat.

12. Tehnica testului de toxigeneză *in vitro* prin precipitare în gel (după Elek-Ouchterlony-Frobisher). Metoda se bazează pe precipitarea toxinei elaborate de tulpina de cercetat, în prezenţa antitoxinei, ambele difuzate în agar. În zona de realizare a amestecului, în proporţii optime dintre toxina antigen şi antitoxina difuzată în agar, se produce un precipitat liniar sub forma unor săgeţi simetrice situate pe o diagonală dintre linia orizontală, formată de cultura de cercetat şi banda perpendiculară de hîrtie de

filtru, îmbibată în antitoxină. Testul apare pozitiv după 24—48 de ore de incubare la termostat, iar benzile de precipitare se intensifică prin păstrare încă 2— 4 zile la gheţar.

Mediul de bază :	macerat de carne	100	ml
	peptonă	2	g
	geloză fibre	1,5	g
	clorură de sodiu	0,5	g

Se ajustează la pH 7,8 şi se autoclavează 15 minute la 120°. Se filtrează prin vată. Se repartizează în flacoane, în cantităţi măsurate. Sterilizare 20 — 30 de minute la 110°. Mediul se păstrează la gheţar. Pentru utilizare, la mediul topit şi răcit la 45°, se adaugă în mod steril ser normal de bou, în proporţie de 20 % ; se amestecă prin agitare uşoară, apoi se repartizează în plăci Petri. După ce mediul a fost turnat în plăci şi în timp ce agarul este încă moale, se încorporează în fiecare placă cîte o bandă de hîrtie de filtru de aproximativ 8 × 1,5 cm, sterilă, care se îmbibă în prealabil în ser antidifteric nefenolat de 500 — 1 000 U.A./ml. Fişia de filtru va fi depusă în centrul plăcii, apoi apăsată cu pensa pentru a fi înglobată în profunzimea stratului de agar. Mediul este lăsat să se solidifice, apoi plăcile se aşază la termostat pentru a se usca. Însămînţarea tulpinii de cercetat se face din cultura de 24 de ore pe mediul Löffler, în striuri perpendiculare cu banda de hîrtie de filtru. Se pot însămînţa pe o placă Petri 3 — 5 tulpini. La fiecare lot de mediu se va însămînţa şi o tulpină de colecţie sigur toxigenă (martor pozitiv).

Se incubează 24 — 48 de ore la termostat. Banda de precipitare apărută în cazul unei reacţii pozitive se intensifică prin păstrare la gheţar. Reacţia pozitivă, tradusă prin apariţia liniilor de precipitare, pune diagnosticul de *C. dyphtheriae* toxigen. Lipsa liniilor de precipitare arată lipsa de toxinogeneză a tulpinii, dar nu infirmă diagnosticul de *C. dyphtheriae.*

Epidemiologie

Ca în orice boală transmisibilă, procesul epidemic în difterie este legat de cei trei factori : sursa de infecţie, calea de transmitere şi starea de receptivitate a populaţiei.

Difteria este o boală răspîndită pe tot globul, dar mai frecvent întîlnită în regiunile cu climă temperată şi rece. Ea poate apărea tot timpul anului, însă morbibiditatea şi mortalitatea sînt mai ridicate în lunile de iarnă.

Repartiţia pe vîrstă este în raport cu gradul de imunitate al organismului ; de obicei boala este mai frecventă între 2 şi 5 ani, dar poate apărea la orice vîrstă. De la 5 la 15 ani, morbiditatea descreşte cu vîrsta, peste 15 ani devine rară. Starea de receptivitate a organismului este condiţionată de absenţa antitoxinei din organism sau prezenţa în titruri foarte scăzute, sub titrul protector de 0,03 U.A./ml de sînge circulant.

Experienţele arată că imunitatea activă conferită prin vaccinarea cu anatoxină, corect aplicată, duce în mod constant la scăderea la maximum a morbidităţii. De asemenea, observaţiile demonstrează că acolo unde, din anumite motive, s-au produs deficienţe în vaccinare, morbiditatea reapare. Mortalitatea, în general, variază în raport cu gravitatea epidemiei, cu indicele de depistare a bolii şi cu vîrsta, fiind mai mare în copilărie şi scăzînd spre adolescenţă.

Infecţia difterică apare de obicei sub formă de focare mici şi persistă pe un fond endemo-epidemic cîţiva ani în şir. După McLeod şi Topley (1950), factorul principal de răspîndire a difteriei este densitatea mare a populaţiei, mediul urban favorizînd menţinerea epidemicităţii bolii. Deşi mediul urban este favorabil apariţiei epidemiilor, mediul rural este cel care menţine endemicitatea bolii atunci cînd condiţiile de igienă şi sanitare sînt deficitare şi nivelul cultural al populaţiei este scăzut.

Sursa de infecţie este reprezentată de bolnav şi purtătorii de germeni, contacţi, convalescenţi sau purtători sănătoşi. În ceea ce priveşte bolnavul, se impune depistarea cît mai rapidă, urmată de izolare, tratament şi sterilizare. Diagnosticul în difterie însă nu este totdeauna uşor, mai ales la copii parţial vaccinaţi, unde boala evoluează adeseori atipic. Chiar în cazurile clinice de difterie tipică, diagnosticul de laborator se face cu oarecare întîrziere; totuşi el este util pentru confirmarea diagnosticului clinic şi stabileşte biotipul tulpinii de *C. dyphtheriae* izolate, procurînd astfel date importante pentru investigaţiile epidemiologice.

Numeroase date din literatură semnalează răspîndirea diverselor biotipuri de *C. dyphtheriae* în diverse situaţii epidemice. Anderson, Happold, McLeod şi Thompson (1933) semnalează existenţa tipurilor *gravis* şi *mitis*, făcînd o corelaţie cu gravitatea bolii. Alţi autori, Sara Branham (1959, U.S.A.), Kurokowa (1959, Japonia), Salamandra (1960, Italia)., Biersteller (1960, Germania), Hrusciova (1959, U.R.S.S.) şi Hartman (1959, Berlin), arată predominanţa în focarele epidemice a tipului *C. dyphtheriae gravis* toxigen.

Cercetările efectuate în ţara noastră de Calalb, Saragea şi colaboratorii (1962) arată prezenţa în focare a unui tip epidemigen, izolat în proporţie de 99,8% de la bolnavi şi contacţii din focare, reprezentat de *C. dyphtheriae gravis* toxigen, lizogen şi lizosensibil, dotat cu o mare agresivitate şi viteză de răspîndire în focar. Această capacitate mare de invazivitate face ca nedepistarea la timp a cazurilor de boală să permită constituirea rapidă a unui număr mare de contacţi şi purtători cu aceeaşi tulpină de *C. dyphtheriae.*

În ceea ce priveşte purtătorii de germeni, aceştia pot fi împărţiţi în două categorii: o categorie a purtătorilor contacţi din focare, contaminaţi totdeauna cu aceeaşi tulpină de difterie *gravis* toxigenă ca şi la bolnavi şi care reprezintă o proporţie de 20—30% şi o categorie a purtătorilor din colectivităţile indemne, contaminaţi de obicei cu tulpini de *C. dyphtheriae gravis*, *mitis* sau *intermedius*, de obicei netoxigene, reprezentaţi de o proporţie de 1—2%.

Existenţa acestor purtători de germeni netoxigeni este deosebit de importantă din punct de vedere al etiopatogeniei difteriei. Freeman (1951), Hewitt (1952), Groman (1953), Narbutowicz (1955), Svet Moldawski, (1956), Ciucă şi colaboratorii (1957) au arătat şi dovedit posibilitatea de transformare, sub acţiunea bacteriofagului specific omolog sau heteriolog, a unei tulpini netoxigene şi avirulente de *C. dyphtheriae*, spre virulenţă-toxigeneză. Ca urmare a acestor constatări, fagii pot fi priviţi ca agenţi inductori ai toxigenezei la *C. dyphtheriae*, cu rol important în modificarea caracterelor formelor clinice şi ale epidemiilor. Avînd în vedere că bacteriofagii sînt foarte răspîndiţi în natură şi că plasticitatea lor este foarte mare, existenţa tulpinilor netoxigene de *C. dyphtheriae* nu poate rămîne indiferentă. În lumina acestor cercetări este posibil ca prezenţa tulpinilor netoxigene, deşi într-un procent aşa de mic, să ofere un fond pentru variabilitate spre toxinogeneză, sub influenţa unui fag homolog sau hetorolog. Luînd în consideraţie acest aspect, prezenţa tulpinilor de *C. dyphtheriae* netoxigene în colectivităţi trebuie privită ca o sursă potenţială de izbucnire a unei epidemii.

În ceea ce privește investigația epidemiologică prin lizotipie, Saragea și colaboratorii (1962) stabilesc lizotipuri în cadrul biotipului *gravis*, *mitis* și *intermedius*, realizînd o schemă de lizotipie cu ajutorul căreia s-au putut lizotipa 70—90% din tulpinile izolate. În acest sens se remarcă o specificitate strînsă între biotip și lizotip, iar investigațiile epidemiologice arată că toate tulpinile provenite dintr-un focar aparțin unui aceluiași lizotip.

Studiul raporturilor fago-bacteriene de *C. dyphtheriae*, pe lîngă starea de lizosensibilitate, a pus în evidență și starea de lizogenie care este prezentă la toate tulpinile toxigene.

În ceea ce privește calea de transmitere, ea poate fi directă, de la bolnav la purtător, fiind reprezentată de picăturile de salivă, picăturile Pflügge, împrăștiate prin tuse, strănut sau vorbire.

Calea indirectă poate fi reprezentată de obiectele bolnavului, care se mențin contaminate 4—5 săptămîni (Topley, 1950); laptele care poate fi contaminat de un purtător, poate constitui și el o cale de transmitere.

Al treilea factor care influențează evoluția pe care o poate lua o epidemie de difterie, este starea de receptivitate a populației și aplicarea unui program de vaccinări obligatorii, riguros controlate, cu un profilactic cu o eficacitate și inocuitate perfectă, contribuie la ridicarea nivelului imunologic al populației și în acest mod conduce la eradicare.

Testarea receptivității populației se face cu ajutorul reacției imaginate de Schick. Reacția Schick este o intradermoreacție, bazată pe acțiunea eritematoasă și dermonecrotică a toxinei difterice la indivizii receptivi și pe neutralizarea acțiunii toxinei de către antitoxina circulantă, tradusă prin lipsa de reacția lor nereceptivă.

În condițiile aplicării în masă, această reacție furnizează informații prețioase asupra:

— nivelului imunologic al populației,

— depistării persoanelor susceptibile la difterie într-un focar epidemic,

— controlul eficienței acțiunii de vaccinare.

Pentru efectuarea acestei reacții, se folosește toxină difterică sterilizată, diluată astfel încît o doză Schick să conțină 1/50 DLM în 0,2 ml. Ca martor de specificitate a reacției se utilizează aceeași diluție de toxină, inactivată prin încălzire 30 de minute la 80°. Reacția se efectuează pe fața anterioară a antebrațului, unde se injectează pe cale intradermică 0,2 ml toxină Schick. La antebrațul stîng se injectează simetric 0,2 ml martor Schick. Citirea se face la 48 de ore; reacția pozitivă se manifestă prin eritem, infiltrat și uneori ușoară necroză.

Intensitatea reacției se notează cu +, ++, +++, în funcție de diametrul eritemului local. O reacție cu diametrul sub 10 mm se consideră negativă.

Eritemul ajunge la maximum în 4 zile, apoi dispare după 6—8 zile, lăsînd o descuamare sau o ușoară pigmentație care poate persista cîteva săptămîni. Uneori însă, poate apărea, pe lîngă reacția la toxină, reacția și la martor, realizînd ceea ce se numește o pseudoreacție. Citirea se va face în acest caz ca și la 4 zile, deoarece falsa reacție dispare în acest interval, în timp ce adevărata reacție de toxină ajunge la maximum de intensitate. Uneori se produce o reacție pozitivă combinată, cînd după 48 de ore eritemul apare la ambele antebrațe, dar apoi dispare la martor și se intensifică la toxină.

Din tabelul LVI se pot urmări rezultatele posibile și interpretarea reacției Schick :

Tabelul LVI

Reacția la locul unde a fost inoculată toxina activă	Reacția la locul unde a fost inoculată toxina inactivată martor	Interpretarea rezultatelor
+++; +++; +	—	reacție pozitivă
—	—	reacție negativă
±	±	pseudoreacție
++, ++, +	±	reacție pozitivă combinată

Dificultatea de a interpreta reacția Schick cu reacția combinată sau cu pseudoreacția este cu atît mai mare, cu cît ele afectează mai mult indivizi înaintați în vîrstă. Ele au fost atribuite unei hipersensibilități a individului față de substanțele elaborate de germen și existente în filtratul de cultură, deoarece testarea antitoxinei circulante la asemenea indivizi este în general în cantitate suficientă.

Relyveld, Henocq, Raynaud (1962) consideră că o pseudoreacție intens pozitivă este o indicație că individul este hipersensibil și probabil imun. În scopul de a evita asemenea situații neconcludente, autorii preconizează efectuarea reacției Schick cu toxină purificată.

Bonsfield și Holt (1962) consideră că la copii incomplet vaccinați testul Schick poate avea un efect stimulant, contribuind la instalarea unei imunități solide consecutive.

Reacția Schick, negativă la nou-născuți și sugarii pînă la 6 luni, devine pozitivă, pentru a se negativa ulterior pe măsură ce copiii înaintează în vîrstă, ca urmare a imunizărilor oculte.

Cea mai importantă armă profilactică împotriva difteriei o constituie însă mărirea rezistenței specifice a populației receptive, cu ajutorul anatoxinei difterice.

În imunizarea activă se poate folosi, fie anatoxină difterică nativă de tip Ramon, fie purificată de tip A.D.P.A. sau vaccinurile asociate divaccin diftero-tetanic sau trivaccin diftero-tetanic-pertussis. Succesul imunizării este în funcție de calitatea antigenică a produsului, de respectarea dozelor și a intervalului între doze.

Belikova, Aldakova (1961) consideră că eficacitatea vaccinărilor depinde în mare măsură și de starea de sănătate perfectă a copiilor în momentul aplicării vaccinului. Copiii care se vaccinează fără a fi deplin sănătoși, manifestă o areactivitate totală sau parțială față de vaccin. Este bine ca, pentru aceste cazuri areactive de copii vaccinați dar neimunizați, să se folosească pe scară largă reacția Schick, pentru a vaccina în mod suplimentar copiii care prezintă reacția Schick pozitivă.

Menținerea imunității se va efectua prin injecții de rapel și în general depinde de titrul profilacticului administrat.

Ca un rezultat al imunizării prin vaccinare, se constată considerabila scădere a incidenței difteriei în țările care au aplicat sistematic și riguros programul de vaccinare antidifterică.

Listeria monocytogenes şi listeriozele

Prof. Alexandrina Gaiginschi

Listeria monocytogenes, sinonim *Bacterium monocytogenes* (Murray), face parte din genul *Listeria*, familia *Corynebacteriaceae.*

Listeria monocytogenes este agentul etiologic al listeriozei, boală întîlnită la animale (ovine, bovine, porcine, iepuri, cobai), la păsări şi la peşti (păstrăvi), de la care se poate contamina omul.

Boala se caracterizează din punct de vedere clinic prin tulburări nervoase şi digestive, iar anatomopatologic prin formarea unor focare inflamatoare şi noduli necrotici în meninge, creier, cerebel, măduva spinării, precum şi în ficat şi miocard.

Istoric. Germenul a fost pus în evidenţă pentru prima oară la iepure de către Hülphen, în anul 1911, în leziunile necrotice ale ficatului. În anul 1924, Murray, Webb şi Swann izolează germenul în crescătorii de iepuri şi cobai, iar în 1926 aceiaşi autori au descris *Bacterium monocytogenes* ca agent cauzal al unei boli comune omului şi animalelor.

Numele de *Listeria monocytogenes* a fost dat de către Pirie, care l-a izolat în 1927, în Africa de sud, de la şoarecele de deşert.

În anul 1929, *L. monocytogenes* a fost pus în evidenţă în lichidul cefalorahidian al unui bolnav cu simptome de meningoencefalită. Ulterior, cazuri de listerioză au fost semnalate la numeroase specii animale, păsări şi om, în diferite regiuni ale globului : S.U.A., Australia, Europa.

În U.R.S.S., boala a fost descrisă de către Svinţov încă din anul 1948; Tregubova în 1949 şi Uspenski în 1954 o semnalează de asemenea.

La noi în ţară, listerioza a fost identificată în 1951 de către Volintir şi Ungureanu, care au izolat *L. monocytogenes* de la porci şi capre care prezentau simptome rabiforme. În fine, în 1956, boala a fost semnalată şi la peşti.

Habitat. *Listeria monocytogenes* este un parazit al animalelor. Nu se cunoaşte pînă în prezent habitatul ei obişnuit. Germenul a fost pus în evidenţă în organismul animalelor bolnave, precum şi la numeroase animale sănătoase; există purtători şi printre animalele sălbatice. În 1953, Krato-Kleril izolează germenul de la şobolanii de cîmp şi din corpul căpuşei *Ixodes ricinus.*

Caractere morfologice. Din punct de vedere morfologic, *L. monocytogenes* se aseamănă cu bacilul rujetului, cu care a fost uneori confundată.

În produsele patologice se prezintă sub forma unor bastonaşe fine, de 1—8 μ lungime, izolate sau grupate în lanţuri scurte, intra- sau extracelulare; în culturi este foarte polimorf, întîlnindu-se forme filamentoase de 15—20 μ.

Este un germen mobil, avînd 1—4 cili dispuşi peritrichi. Mobilitatea este mai activă la 25° şi este mai redusă la 37°, dispărînd uneori după 72 de ore.

Nu are spori; nu prezintă capsulă; este gram-pozitiv.

Caractere de cultură. Se dezvoltă pe medii uzuale; creşterea este favorizată de prezenţa extractului de ficat, glucozei, serului şi a sîngelui. În bulion se dezvoltă tulburînd uniform mediul, prin agitare formînd valuri caracteristice; prin învechire, cultura sedimentează şi formează un depozit vîscos, care aderă de fundul eprubetei şi se ridică prin agitare sub forma unui vîrtej.

În bulionul adiţionat cu ser, depozitul este granulat, iar mediul rămîne limpede.

Pe geloză se dezvoltă sub formă de colonii mici, transparente, cu aspect de picături de rouă, care prin învechire devin vîscoase, opace.

În gelatină cultivă sub formă de colonii mici care se dezvoltă pe linia de însămînţare, fără a modifica mediul. Cultivă în apă peptonată şi în medii cu lapte şi nu se dezvoltă pe cartof glicerinat.

Pe agar cu extract de ficat, *L. monocytogenes* se dezvoltă sub formă de colonii circulare, de forma „S", uşor turtite, lăptoase la lumina reflectată.

Caractere biochimice şi de metabolism. Aerob şi facultativ anaerob. Se dezvoltă în limite largi de temperatură (4—44°), temperatura optimă fiind între 20 şi 37°; pH optim 7—7,6.

Pe mediu cu lapte turnesolat, acidifică mediul fără coagularea laptelui şi îl decolorează.

Nu are proprietăţi proteolitice; nu lichefiază gelatina şi serul coagulat. Nu formează indol în apă peptonată. Nu produce H_2S. Nu reduce nitraţii în nitriţi; este catalazo-pozitiv.

Pe medii cu geloză şi sînge, după 48 de ore de cultivare, produce o zonă de hemoliză în jurul coloniilor, caracter prin care se deosebeşte de bacilul rujetului care nu are această proprietate.

Acţiunea fermentativă faţă de substanţele hidrocarbonate este variată, datele din literatură fiind contradictorii. După Bergey, toate tulpinile fermentează puternic salicina, ramnoza, trehaloza şi glucoza şi mai slab dextrina, zaharoza şi amidonul; maltoza şi lactoza sînt fermentate numai de unele tulpini. După Justin şi Sterberg, *Listeria monocytogenes* fermentează constant dextroza, ramnoza, maltoza şi esculina, proprietăţi care deosebesc *Listeria monocytogenes* de bacilul rujetului, care nu are acţiune asupra acestor substanţe.

Nu are acţiune asupra: xilozei, manitolului, dulcitolului, inulinei şi inozitolului. Comportarea faţă de melezitoză a permis diferenţierea a două biotipuri (Seeliger, Nestorescu şi colaboratorii).

Caracteristica cea mai importantă a *L. monocytogenes* este creşterea marcată a monocitelor din circulaţie, cînd acest germen este inoculat intravenos sau intraperitoneal la iepure. Monocitoza este indusă de extractul lipidic solubil în cloroform (Stanley).

Rezistența la agenții fizici, chimici și biologici. În medii de cultură, vitalitatea germenului se păstrează 2—6 luni pînă la un an; în organele infectate și îndeosebi în creierul păstrat în glicerină, vitalitatea bacilului se păstrează pînă la 6 luni. Supraviețuiește 8 săptămîni în NaCl 20% la +4°.

Este sensibil la căldură, fiind omorît la 55°, în 60 de minute și la 60°, în 30 de minute. Sensibil la acțiunea bacteriofagilor specifici. Sword și Pickett (1961) au elaborat chiar o schemă de lizotipie.

Structura antigenică. *Listeria monocytogenes* conține antigene flagelare „H'' și antigene somatice „O'' (Paterson).

Prin metode de seroaglutinare au fost determinate 4 tipuri serologice de *Listeria monocytogenes*, purtînd indicația 1, 2, 3, 4. Serotipul 4 se subdivide în serotipul 4a și 4b. Pe baza cunoașterii structurii antigenice, Paterson a elaborat o schemă de diagnostic antigenic, completată ulterior (1956) de către Seeliger și Linzen-Meier, pe care o redăm în tabelul LVII.

Tabelul LVII

Serotip	Numărul tulpinii-origine	Fracțiuni antigenice	
		„O''	„H''
1	7973	I, II ...	A, B
2	5348	I, II ...	B, D
3	5105	II, IV	A, B
4a	5214	V a, b	A, B
4b	1071/53	V a, c	A, B, C

Prin reacții de seroprecipitare se descriu 2 tipuri de *Listeria monocytogenes*: tipul 1, izolat de la rozătoare și tipul 2, izolat de la animalele rumegătoare. Între tipuri nu există imunitate încrucișată.

Din corpul bacilului s-a extras un polizaharid precipitabil cu serurile precipitante.

Caractere de patogenitate. În culturi nu a fost pusă în evidență o exotoxină; germenul secretă însă o endotoxină cu acțiune necrotică asupra celulelor ficatului, splinei, plămînului și miocardului.

Patogenitatea germenului este determinată de virulență, de proprietatea de invazie, cît și de capacitatea de multiplicare în țesuturile vii.

Virulența variază în limite largi de la o tulpină la alta; există tulpini foarte virulente, alături de tulpini cu virulență scăzută, ambele tulpini putînd fi izolate de la animalele infectate.

Listeria monocytogenes este un germen cu rol important în medicina veterinară, deoarece provoacă infecții la numeroase specii animale (ovine, porcine, bovine, iepuri, păsări și pești). La animale, boala evoluează sub formă de meningoencefalite sau cu o simptomatologie puțin evidentă. Boala apare de obicei în timpul iernii sau începutul primăverii, cînd animalele consumă hrana uscată, săracă în vitamine.

La ovine, boala se manifestă prin tulburări nervoase: crize convulsive, tulburări de echilibru și incoordonarea mișcărilor, paralizia mușchilor masticatori, o deviație laterală a gîtului și tulburări ale vederii. Pe lîngă cazuri manifeste de boală se întîlnesc la ovine și forme inaparente, care se depistează prin examenul serologic; de asemenea se cunosc şi forme abortive.

La porcine, infecţia se întîlneşte mai mult sporadic şi îndeosebi la purceii tineri; boala îmbracă trei forme: nervoasă, cu manifestări meningo-encefalice (agitaţie, accese epileptiforme, pareze, hemiplegii), forma septicemică şi forma cutanată.

La bovine se descriu forme nervoase cu encefalită şi paralizia facialului, agitaţie (învîrtire în cerc); se semnalează şi avorturi. La cai, boala se manifestă prin tulburări nervoase, febră şi astenie.

La cobai şi la iepuri, boala apare în mod natural, de obicei în timpul iernii, cînd animalele primesc o hrană săracă în vitamine; la aceste animale, boala durează 8—10 zile şi se manifestă printr-o slăbire accentuată şi tulburări nervoase (pierderea echilibrului, ţinerea capului într-o parte, mişcări convulsive ale membrelor şi capului).

La păsări, care prezintă boala spontan, se descriu, pe lîngă somnolenţă şi diaree, tulburări nervoase importante, cu sfîrşit letal. Infecţia se poate transmite accidental de la animale la om, prin diferite produse.

La om, listerioza îmbracă o formă meningiană şi o formă septicemică. Forma meningiană are debut brusc, cu febră ridicată, delir, agitaţie şi fenomene meningiene grave. Forma septicemică se manifestă cu frisoane şi febră ridicată, 39—40°, fiind complicată deseori cu bronhopneumonie sau meningită purulentă.

După Gutkova, în clinica umană se deosebesc mai multe forme de listerioză: angiosepticemică cu mononucleoză, oculo-granulomatoasă, septicotifică, meningo-encefalitică, septică-granulomatoasă şi listerioza de graviditate. Dintre acestea, amigdalitele provocate de *Listeria monocytogenes* sînt cele mai frecvente, germenul în aceste cazuri fiind izolat din faringe şi de pe amigdale.

Infecţia experimentală. Animalele cele mai sensibile sînt: iepurele, şoarecele, şobolanul şi, dintre păsări, găina; cobaiul este mai puţin sensibil decît iepurele.

Iepurele tînăr poate fi infectat cu *Listeria monocytogenes* pe diferite căi: 0,1 ml dintr-o cultură de 24 de ore în bulion, administrată subcutanat, intraperitoneal sau pe cale venoasă, omoară animalul în 3—5 zile; la autopsie se pun în evidenţă noduli necrotici în ficat, epiploon şi capsule suprarenale, în care germenii se găsesc în număr mare. Inocularea pe cale cerebrală la acest animal a unei doze de 0,01 ml cultură de *Listeria monocytogenes* determină o meningită purulentă cu moartea animalului în 2—3 zile.

Instilînd în sacul conjunctival o picătură de cultură, se poate provoca la iepure o keratoconjunctivită purulentă cu mononucleoză; tulburările oculare apar la 24 de ore sau mai tîrziu, caracterizîndu-se prin fotofobie, edem al pleoapelor şi inflamaţia conjunctivei. Corneea se opacifiază şi prezintă la suprafaţa sa fine crăpături. Uneori animalul poate pierde ochiul prin ulceraţia corneei. În general, boala se termină în 5—10 zile, cu vindecare. Această reacţie, descrisă de către Anton în 1934 şi mai tîrziu de către Morris şi Julianelle, este folosită pentru identificarea germenului, deosebindu-se de bacilul rujetului care nu provoacă aceste leziuni.

Pentru a produce la iepure o boală cu evoluţie letală, similară cu cea naturală, se inoculează pe cale subcutanată o doză mai mică de cultură

(1 ml dintr-o soluție 1/10) după care se constată în 5—6 zile leucocitoză cu mononucleoză intensă (16 000—18 000 leucocite/mm³).

Șoarecele inoculat subcutanat cu 0,1 ml cultură de 24 de ore, moare în 6—10 zile, la autopsie punîndu-se în evidență noduli necrotici în ficat și splină. Inoculați pe cale peritoneală, șoarecii mor în 1—14 zile, pe cînd inoculați pe cale intranazală (cea mai severă) se determină fenomene de meningită și hepatită necrozantă, apropiate de infecția naturală.

Șobolanul se infectează în aceleași condiții.

Cobaiul este mai puțin sensibil; inoculat pe cale subcutanată cu 0,1 ml cultură de 24 de ore, nu se obțin leziuni locale sau fenomene generale; doza de 0,5 ml cultură determină un ușor edem local care se vindecă. Inoculat pe cale peritoneală sau venoasă cu 0,1 ml cultură, animalul moare în 3—5 zile, la autopsie constatîndu-se focare necrotice în ficat și miocard. Instilînd cultura pe mucoasa conjunctivală, în 2—3 zile se observă conjunctivita purulentă însoțită de keratită.

Găina, inoculată pe cale venoasă cu 1 ml cultură de *Listeria monocytogenes*, moare, cu diaree, în comă, după 7 zile. La autopsie se constată leziuni necrotice în ficat și miocard.

Infecția embrionilor de găină, în vîrstă de 14 zile, determină moartea acestora cu leziuni necrotice pe membrana corioalantoidă, ficat, inimă, sistem nervos.

Imunitate. Se citează cazuri de imunitate naturală pentru unele specii animale. În organismele infectate apar anticorpi aglutinanți.

Tratament. *Listeria monocytogenes* este sensibilă la acțiunea sulfamidelor. Administrarea acestor substanțe a dat rezultate bune în tratamentul infecției umane.

Penicilina, streptomicina, aureomicina utilizate în listerioza umană au dus la vindecări.

Diagnosticul de laborator

Diagnosticul de laborator al infecțiilor cu *Listeria monocytogenes* se practică prin metode directe și prin metode indirecte.

Metodele directe au de scop să pună în evidență *L. monocytogenes* în produsele recoltate de la bolnav (lichid cefalorahidian în formele meningiene; sînge, în formele septicemice; exsudat amigdalian și faringian în angine etc.), precum și în leziunile cadavrelor. În meningitele provocate de *Listeria* se constată în lichidul cefalorahidian albumina crescută și hiperleucocitoză cu limfocitoză.

În depozitul de centrifugare al lichidului cefalorahidian, germenii se găsesc în număr mic intra- sau extracelular, avînd aspectul de bacili gram-pozitivi.

Pentru izolarea germenului se practică însămînțări pe medii uzuale la care se adaugă glucoză, ser, sînge sau extract de ficat; identificarea se face cu ajutorul caracterelor biochimice, serologice (aglutinare cu serurile imune anti-*Listeria monocytogenes*) și proba patogenității pe iepure sau cobai, instilînd cultura pe mucoasa conjunctivală cu scopul obținerii keratoconjunctivitei.

În cazuri de septicemie se practică hemocultura, germenul izolat fiind identificat după aceleași criterii.

Examenul sîngelui poate da unele indicații pentru diagnosticul etiologic, îndeosebi cînd se pune în evidență o mononucleoză ridicată.

La cadavrele animalelor, germenul este căutat îndeosebi în creier și în leziunile necrotice din organe.

Examenele serologice (seroaglutinarea) pot fi folosite pentru diagnosticul listeriozei umane și animale.

Epidemiologie

Deoarece nu se cunosc habitatul germenului și nici calea de pătrundere în organism, nu se pot preciza măsurile de combatere a bolii.

Se practică izolarea animalelor bolnave și măsuri care să împiedice contaminarea omului care vine în contact cu animalele bolnave.

Măsurile de profilaxie specifică prin vaccinare, aplicată la animale, nu au dat rezultate concludente.

Genul Mycobacterium

Dr. C. C. Oprescu

Germenii din acest gen, grație marii lor răspîndiri în natură, ca și raporturilor pe care le au cu diferitele gazde pe care le parazitează — printre care se numără în primul rînd specia umană — prezintă un interes deosebit pentru biologie și medicină.

În genul *Mycobacterium* sînt cuprinși germeni *patogeni* și germeni *saprofiți*.

Printre speciile patogene trebuie reținute : *M. leprae* (Hansen, 1868), agentul cauzal al leprei umane ; *M. tuberculosis, var. hominis* (Koch, 1882) și *M. tuberculosis, var. bovis* (Smith, 1898), agenții cauzali ai tuberculozei mamiferelor ; *M. avium* (Strauss și Gamaleia, 1891), agenul patogen al tuberculozei păsărilor ; *M. lepraemurium* (Stefanski, 1903), agentul etiologic al leprei șobolanilor ; *M. muris* (*Vole bacillus*), care ar reprezenta al treilea tip de micobacterie patogenă pentru mamifere.

În afară de speciile de micobacterii semnalate mai sus, mai există o altă serie de micobacterii patogene pentru animalele cu sînge rece, printre care : *M. ranae*, patogen pentru broaște ; *M. thamnopheos*, patogen pentru șerpi ; *M. marinum*, patogen pentru pești, precum și o serie de micobacterii saprofite care se găsesc în sol, apă, plante etc. Printre acestea sînt de semnalat : *M. phlei* ; *M. smegmatis* etc.

Pe lîngă aceste specii se mai întîlnesc : *M. paratubeculosis* (printre care bacilul Johne).

Mycobacterium tuberculosis și tuberculoza

Istoric. În antichitate, infecția era cunoscută sub numele generic de „ftizie", sindrom consumptiv în care se înglobau mai multe afecțiuni asemănătoare tuberculozei, și între care aceasta ocupă locul cel mai însemnat.

De-abia în secolul al XVII-lea Sylvyus și Morton descriu leziunile pulmonare specifice, pe care le numesc tuberculi. Laennec a arătat primul specificitatea și unitatea infecției tuberculoase.

Villemin a dovedit experimental, prin inocularea la animal a „materiei tuberculoase", transmisibilitatea şi contagiozitatea bolii. De aci înainte, tuberculoza nu mai poate fi considerată ca o „diateză", ci ca o boală infecţioasă transmisibilă în serie. Presupunerea lui că tuberculoza apare datorită unui „germen venit dinafară" este confirmată prin descoperirea, de către Koch, a agentului cauzator al bolii, bacilul care-i poartă numele (1882). Koch demonstrează prezenţa bacilului în toate leziunile specifice, în produsele patologice provenite de la organismele infectate, îl izolează în culturi pure care, inoculate la animalul sensibil, reproduc în mod constant boala.

Habitat. Bacilul tuberculozei este un parazit obligatoriu. De aceea, el nu trăieşte liber în natură, în afara gazdelor pe care le parazitează. La om, contagiunea este aproape totdeauna interumană, infectarea prin intermediul obiectelor contaminate fiind o eventualitate relativ rară. Contaminarea prin praful străzilor, localurilor publice şi mai ales al celui din camerele unde au zăcut bolnavi de tuberculoză deschisă este posibilă, dacă nu a trecut prea multă vreme de la înlăturarea sursei de contagiune. Această sursă o constituie, în imensa majoritate a cazurilor, sputa baciliferă.

Caractere morfologice şi tinctoriale. Micobacteriile se prezintă sub formă de bastonaşe, bacili, relativ mici, de formă neregulată, uneori ramificaţi, drepţi sau uşor încurbaţi, cu extremităţile uşor curbe, omogeni sau cu granulaţii. Pot apărea, fie izolaţi, fie alipiţi printr-una din extremităţi, foarte adesea reuniţi în mici grămezi, în care corpii microbieni formează figuri în L, X, V. Se colorează în general uniform, uneori segmentar, cu regiuni mai clare, refractare la colorare. Cu coloraţii speciale, la unele tipuri se pot distinge în corpul microbian *granulaţii* dispuse longitudinal în citoplasmă, cu dispoziţie uneori bipolară. Există forme granulare şi altele agranulare. În culturi vechi se întîlnesc şi forme măciucate, actinomicoziforme (Mecinikov, Babeş). Sînt imobili, fără endospori, cultivînd anevoie îndată după izolarea lor din organism. Cresc şi se înmulţesc lent, necesitînd prezenţa, în mediile de cultură, de substanţe organice şi condiţii de aerobioză. Toţi sînt acidorezistenţi, unii fiind şi acido-alcoolorezistenţi.

Bacilul tuberculozei mamiferelor este foarte greu de distins, morfologic şi tinctorial, de celelalte micobacterii. Se prezintă ca un bastonaş de dimensiuni variabile (1—4μ lungime şi 0,3—0,6μ grosime). Tipul bovin este mai gros şi mai scurt decît cel uman. În organism, bacilii sînt în general mai lungi decît în culturi. În corpul bacilar se pot pune în evidenţă, prin tehnici speciale (metoda Fontès), granulaţii cromofile (*gramofile*) a căror semnificaţie şi natură nu sînt încă bine lămurite. În colonii, bacilii sînt dispuşi paralel unii faţă de alţii, în sens longitudinal, alcătuind în ansamblu nişte benzi cu aspect de „mustăţi" sau „torsade" dispuse în „ochiuri de reţea" (tipul uman virulent). Elementele bacilare sînt dispuse pe un substrat format dintr-o substanţă cianofilă, pe care se pot observa numeroase forme granulare, care ar rezulta din autoliza corpilor microbieni. Spre deosebire de majoritatea celorlalţi germeni, bacilul tuberculozei este greu permeabil pentru coloranţii acizi sau bazici. De aceea, punerea lui în evidenţă s-a făcut tîrziu şi după eforturi îndelungate. Koch, cel dintîi, a reuşit să-l coloreze după un contact de 24 de ore cu albastru de metilen alcalin. După el, Ehrlich a căpătat rezultate mai bune, folosind violetul de metil și fucsina bazică, la care a adăugat și un mordant (apă anilinată); el a evidențiat și rezistența germenului la decolorarea cu acid azotic diluat. Rindfleisch a înlocuit acidul cu alcool, încălzind totodată colorantul, cu rezultate și mai bune. În fine, Ziehl și Neelsen pun la punct tehnica rămasă clasică pentru colorarea bacilului tuberculozei, bazîndu-se pe necesitatea de a-l trata la cald cu un colorant energic și — după ce a fixat colorantul — de a-l diferenția grație rezistenței la acțiunea decolorantă a acizilor minerali diluați și a alcoolului (vezi partea de tehnică pentru diagnostic). Colorarea germenilor se poate realiza și la *rece*, dacă se prelungește mult contactul cu colorantul bazic sau dacă se adaugă substanțe care ușurează pătrunderea acestuia în corpul bacilar (*Tween 80*, Tergitol etc.), în care caz colorația se face și mult mai rapid (1—3 minute). Caracterul de acidorezistență pare a se datori prezenței unei ceri nesaponifiabile din clasa alcoolilor superiori, cunoscută sub numele de micol. Astfel, s-a constatat că cantitatea de ceară este proporțională cu rezistența la decolorare a germenilor și că bacilii tuberculoși patogeni sînt mai bogați în această substanță decît cei saprofiți. Cercetări mai recente au arătat că, colorația roșie-strălucitoare se datorește membranei citoplasmatice în care a pătruns colorantul în soluție. Prin modificarea integrității celulei bacteriene, acidorezistența poate dispărea. În unele produse patologice (conținutul abceselor reci, cazeumul ganglionar, exsudatele seroase etc.), în care nu se pot pune în evidență bacilii, se pot găsi mici granulații gramofile, descrise pentru prima oară de Much și cunoscute sub numele de „granulațiile Much". Ele ar reprezenta, după unii, un stadiu de dezvoltare a bacilului tuberculos, iar după alții, ar fi simple artefacte.

Caractere de cultură. Micobacteriile *patogene*, adaptate în mod natural la parazitarea celulelor limfatice, se dezvoltă greu și lent pe mediile artificiale de cultură. Cele *saprofite*, al căror parazitism nu este atît de strict, cultivă cu ușurință și cu rapiditate pe mediile simple, uzuale. După izolare, prin treceri repetate, germenii se adaptează progresiv, devenind din ce în ce mai puțin exigenți, dar ritmul lor de dezvoltare continuă să rămînă lent. În general, micobacteriile patogene pentru mamifere (tipul uman, bovin și murin) cultivă foarte anevoios și numai pe medii speciale. Cele de tip *aviar*, patogene pentru păsări, fac tranziția între acestea din urmă și acelea ale *animalelor cu sînge rece* sau cele *saprofite*, a căror cultivare este foarte ușoară și rapidă.

Între diferitele tipuri de micobacterii se constată deosebiri nete în ce privește aptitudinea de a se dezvolta pe diferite medii artificiale. Astfel, creșterea bacililor de tip uman este favorizată de prezența glicerinei în mediu,dînd culturi luxuriante (dezvoltare *eugonică*), aceea a bacilului de tip bovin este parțial inhibată (dezvoltare *disgonică*). Numai după o adaptare prealabilă pe medii neglicerinate (ou coagulat, cartof simplu), dezvoltarea disgonică, lentă și săracă a tipului bovin se modifică, obișnuindu-se să se dezvolte și pe medii cu glicerină. Ca și bacilul de tip bovin, cel de tip murin se dezvoltă mult mai bine pe medii neglicerinate și numai după treceri repetate poate fi adaptat și pe medii glicerinate. Tipul aviar se dezvoltă de la început luxuriant pe mediile glicerinate, iar după cîteva treceri se poate dispensa de prezența glicerinei.

Mediile de cultură propuse pînă astăzi pentru cultivarea micobacteriilor sînt foarte numeroase şi numărul lor continuă să crească neîncetat; dar valoarea lor practică este foarte inegală. În general se pot distinge trei mari categorii de medii, după utilizarea optimă la care ele se pretează în laborator.

1. *Medii de izolare*, care convin pentru obţinerea de culturi pure plecînd de la organe sau produse patologice, şi în compoziţia cărora intră substanţe organice complexe (cartoful glicerinat, sîngele gelozat glicerinat şi mediile cu ou: Dorset, Lübenau, Petroff, Petragnani, Loewenstein, Herrold, Jensen). Sînt medii sensibile şi au cea mai largă utilizare în practică (diagnostic bacteriologic).

2. *Medii de întreţinere*, folosite în special pentru păstrarea în timp a tulpinilor de bacili izolate deja din organism (bulionul glicerinat, cartoful biliat, mediile Ficker, Roemer, Lumière, Laporte).

3. *Medii de adaptare* sau *sintetice*, în care germenii cultivă în condiţii diferite de cele necesare lor, îndată după izolarea din organism, ceea ce impune o cultivare prealabilă pe mediile de izolare adecvate; sînt medii cu o compoziţie chimică bine definită, dar care nu necesită prezenţa nici unui factor anumit de creştere (Sauton, Long, Kirchner-Hermann, Lockemann, Proskauer şi Beck, Sula, Youmans, Dubos etc).

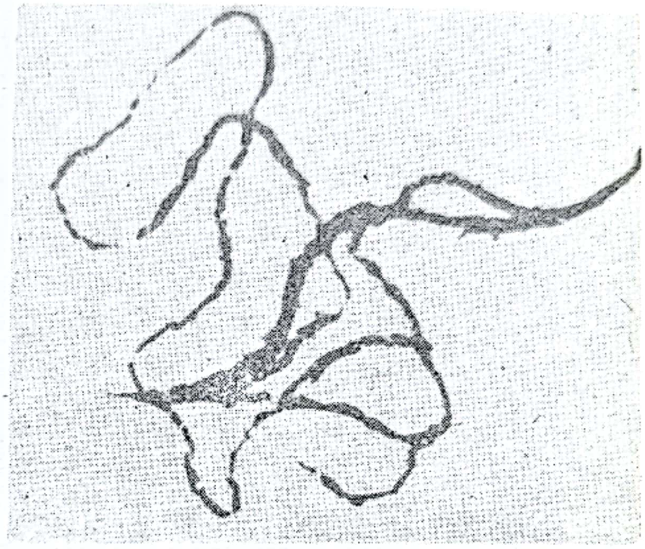


Fig. 117. — Dezvoltarea *M. tuberculosis* în medii lichide (aspect în corzi — ob. 7 ×).

Pe mediile lichide micobacteriile se dezvoltă la *suprafaţa* mediului crescînd sub forma unei *membrane* (*văl*), la început fine, apoi îngroşîndu-se treptat şi întinzîndu-se progresiv pe toată suprafaţa mediului, pînă cînd o acoperă în întregime; adeseori se ridică chiar pe pereţii balonului.

Pe măsură ce se *îngroaşă*, vălul se *cutează* („vălureşte"), lăsînd însă dedesubt mediul perfect limpede. Ajuns la dezvoltarea lui maximă, vălul gros cade la fundul vasului prin propria lui greutate, iar din fragmentele rămase la suprafaţă se poate dezvolta un nou văl. Bacilii de tip uman fac un văl mai gros, care se întinde mai repede pe suprafaţa mediului, în timp ce bacilii de tip bovin fac, de regulă, un văl mai subţire şi cu o dezvoltare în suprafaţă mai lentă. Pe aceste medii, tipul uman alcalinizează la început mediul şi în cursul dezvoltării îl acidifică progresiv, spre deosebire de tipul bovin, care îl alcalinizează de la început, fără acidificare ulterioară.

Pe mediile solide, coloniile de bacili tuberculoşi de tip *uman* apar după 10—15 zile de la însămînţare, sub forma unor puncte albe, care cu timpul se măresc (5—10 mm diametru) şi fuzionează. La început de aspect rotunjit, ele devin repede neregulate, mate, verucoase, cu suprafaţa ondulată sau mamelonată şi cu tendinţă spre pigmentare.

Coloniile de tip *bovin* apar mai tîrziu (20—60 de zile), iar acele de tip *aviar* foarte precoce (7—12 zile) şi se dezvoltă repede, dînd o masă gleroasă, netedă, cremoasă, caracteristică. Bacilii *paratuberculoşi* dau coloniile cele mai precoce şi mai abundente, vizibile microscopic chiar după 48—72 de ore. Un caracter important de cultură al micobacteriilor cultivate pe medii solide este consistenţa şi friabilitatea coloniilor, precum şi gradul lor de *adezivitate* la suprafaţa mediului pe care s-au dezvoltat. Astfel, coloniile de tip uman nu aderă puternic la mediu şi se emulsionează greu în ser fiziologic; cele de tip bovin sînt mai aderente la mediu şi mai uşor emulsionabile în ser fiziologic. Un alt caracter comun al acestui grup de germeni este dificultatea de a se obţine suspensii omogene. Unii autori au descris şi la micobacterii *variante* de tip „S" şi „R", fără a fi putut preciza însă în ce măsură ele s-ar deosebi în ce priveşte antigenicitatea, virulenţa şi metabolismul fiecăreia în parte.

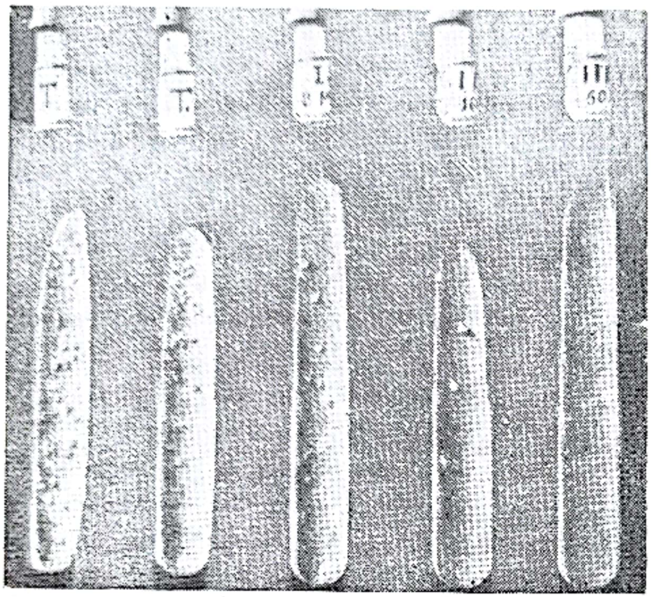


Fig. 118. — Aspectul coloniilor de *M. tuberculosis* pe medii solide.

Caractere de metabolism. Dezvoltarea tuturor tipurilor de micobacterii se face în condiţii de aerobioză — ritmul lor de dezvoltare fiind proporţional cu presiunea de oxigen din mediu — şi la un optim de temperatură care variază de la un tip la altul; 37,5—38° pentru tipurile mamiferelor, 40—41° pentru tipul aviar, 18—37° pentru tipurile saprofite şi cele patogene pentru animalele cu sînge rece.

De asemenea, reacţia mediului (pH) prezintă un optim variabil cu tipul micobacteriei: pentru tipul uman, între pH 7,4 şi 8,0; pentru tipul bovin, între 5,8 şi 6,9, iar pentru tipurile patogene pentru animalele cu sînge rece, între 6,2 şi 7,7.

Rezistenţa la agenţi fizici, chimici şi biologici. Dintre germenii nesporulaţi, micobacteriile — şi în special bacilii tuberculoşi — sînt dintre cele mai rezistente faţă de acţiunea diferiţilor agenţi fizici şi chimici. Această rezistenţă este manifestă mai ales la bacilii cultivaţi pe medii cu ou. La temperatura camerei şi la adăpost de lumina solară, vitalitatea lor se poate păstra intactă luni şi chiar ani de zile. În medii albuminoase (exemplu lapte), vitalitatea se conservă chiar la temperaturi relativ ridicate; astfel, pentru sterilizarea laptelui, se cere menţinerea lui la o temperatură de 70° cel puţin o jumătate de oră. În sputele umede, rezistenţa este atît de marcată, încît bacilii nu sînt afectaţi chiar de o temperatură de 75° timp de 30 minute. În cultură pură însă, sensibilitatea lor la căldură este mai marcată: bacilii sînt omorîţi după 10 minute la 80°

și după 5 minute la 100°. În stare uscată, rezistența la căldură se mărește considerabil, ajungînd să poată suporta o încălzire la 70° timp de peste 7 ore, fără a fi afectați. Acțiunea combinată a uscăciunii și a luminii solare duce însă la o pierdere rapidă a virulenței. Astfel, într-o cameră de bolnav bine însorită și aerată, virulența sputelor devine practic nulă după două săptămîni. Dacă lumina camerei este difuză, virulența bacililor se conservă peste două luni.

Razele ultraviolete au o acțiune bactericidă foarte energică, mai cu seamă dacă bacilii sînt expuși în strat subțire. Procesul de putrefacție nu le influențează notabil vitalitatea, ceea ce face ca bacilii din cadavrele celor morți de tuberculoză să rămînă vii și virulenți multe luni de la înhumare.

Temperaturile joase, și chiar foarte joase (heliu lichid), nu afectează întru nimic vitalitatea micobacteriilor; nici chiar alternanțele de temperatură, între anumite limite, nu au efecte notabile. Prin uscare în stare congelată (liofilizare), culturile de micobacterii își conservă intacte vitalitatea, virulența și antigenicitatea, vreme foarte îndelungată. Conservarea se poate realiza și pentru micobacteriile puse în suspensie, dacă se folosesc pentru aceasta medii glucozate.

În ce privește rezistența micobacteriilor la *agenții chimici*, și în special la antiseptice, ea este foarte variabilă. Bacilul tuberculozei rezistă bine la acțiunea acizilor și alcalilor minerali; astfel acidul sulfuric 10%, hidratul de sodiu 4%, nu îi afectează sensibil vitalitatea, după un contact de 15—30 de minute. Carbonatul de sodiu 10% și fosfatul trisodic 25% nu îl afectează de loc. Antisepticele cele mai active s-au arătat a fi: fenolul care, în concentrație de 5% ucide bacilii în cultură pură după un contact de 4—5 minute; tricrezolul 2% și lizolul 2%, care manifestă o acțiune bactericidă foarte rapidă.

Mycobacterium tuberculosis este sensibil la chimioterapice, printre care: streptomicina, hidrazida acidului izonicotinic (HIN), acidul para-aminosalicilic (PAS), tiosemicarbazona (Tb_1), cicloserina, Th 1314 etc., precum și la asociațiile acestora.

În ultima vreme s-au pus în evidență și bacteriofagi activi asupra mai multor specii de micobacterii.

Compoziția chimică a micobacteriilor este foarte complexă.

1. *Tuberculolipidele* sînt cele mai importante dintre componentele corpului bacilar, atît prin proporția însemnată (30—40% din greutatea uscată a germenilor), cît și prin rolul lor în patogenia infecției. Prin extracții succesive cu solvenți organici (alcool, eter, cloroform, eter de petrol) și eluarea fracțiunilor extrase cu eter, acetonă și cloroform, au putut fi individualizate 3 mari categorii de substanțe lipidice:

— *fracțiunea acetonosolubilă*, care cuprinde acizi grași esterificați (grăsimi neutre) sau neesterificați (liberi), dintre care doi sînt mai importanți: acidul tuberculostearic și acidul ftioic. Acizii grași liberi formează între 25 și 50% din grăsimile acetonosolubile care reprezintă, la rîndul lor, între 2 și 11% din greutatea uscată a germenilor. Grăsimile neutre sînt constituite din esteri de acizi grași cu trehaloză. Injectată pe cale intraperitoneală (iepure) în suspensie uleioasă, fracțiunea acetonosolubilă manifestă proprietăți iritative, provoacă aflux leucocitar, stimulează celulele conjunctive și determină apariția de celule epitelioide;

— *fracțiunea fosfatidică* cuprinde grăsimile insolubile în acetonă, dar solubile în eter. Este un complex format din săruri de sodiu, calciu sau magneziu ale acidului inozito-glicerofosforic, legat, pe de o parte, de acizi grași, iar pe de alta, de un poliozid în care ar intra inozitolul. În aceste fosfatide se regăsesc aceiași acizi grași care există și în grăsimi.

Fracțiunea fosfatidică este purtătoarea funcției haptenice comune tuturor tipurilor de bacili tuberculoși, și pare a fi responsabilă de reacțiile de fixare a complementului, în prezența serurilor specifice. Activitatea ei biologică este remarcabilă : injectată la animal, provoacă o intensă reacție gigantocelulară, care depășește epiploonul, spre a se infiltra în subseroasă, unde produce formațiuni pseudotumorale. Țesutul neoformat evoluează spre cazeificare, care este însă mai puțin intensă decît aceea provocată de germenii vii. Leziunile obținute sînt comparabile cu cele determinate de acidul ftioic, dar mai importante decît ele ;

— *fracțiunea cloroformosolubilă* corespunde cerurilor bacilare și cuprinde aproximativ 48% din totalitatea lipidelor. Conține o proporție însemnată (40%) de polizaharide, care prin hidroliza acidă dau zaharul și esteri ai alcoolilor superiori, de tipul ftiocerolului, cuplați cu acizi grași de felul acidului micolic. Cerurile bacilare care sînt cuprinse în această fracțiune sînt de două categorii : unele extractibile cu alcool-eter (ceara A) și altele extractibile cu cloroform (cerurile B, C și D).

2. *Tuberculoproteinele* bacilare sînt de două categorii : proteine hidrosolubile (simple și complexe sau nucleoproteine) și proteine „legate" de corpul bacilar.

Proteinele simple, difuzibile în mediile de cultură, sînt antigenice și precipită în prezența serurilor specifice. Ele posedă o activitate reacțională de tip tuberculinic, asemănătoare aceleia a proteinelor din tuberculină, dar mai specifică decît a acestora. În ce privește reacțiile tisulare pe care le pot determina, tipul lor variază cu starea fizico-chimică a proteinei injectate : în soluție apoasă determină doar un aflux de polinucleare și o discretă apariție de monocite. Dacă este proaspăt precipitată apar și celule epitelioide, celule gigante și chiar tuberculi. Tuberculoproteinele difuzibile au un rol însemnat în determinarea intoxicației tuberculoase (C. Ionescu-Mihăiești și colaboratorii). Ele determină pe de o parte, efecte toxice cu caracter acut, care pot duce la moartea animalului în 24 de ore cu fenomene de șoc (alterări în plămîni, ficat și rinichi), iar pe de alta, în doze mici și repetate, provoacă o intoxicație cronică, cu leziuni de tip degenerativ, sclerogen. Animalul se cașectizează și prezintă importante modificări sanguine (leucopenie, alterări degenerative ale granulocitelor, tulburări de coagulare și modificări ale proteinelor serice). El se sensibilizează intens anafilactic, și moare cu fenomene de șoc. Tuberculoproteinele au și o marcată acțiune chimiotactică asupra leucocitelor și joacă un rol însemnat în declanșarea fenomenelor congestivo-hemoragice din cursul bolii, prin capacitatea lor de a determina sindroame de tip Schwartzmann-Sanarelli (C. Ionescu-Mihăiești, C. C. Oprescu ș.a.). Nucleoproteinele se desfac în mediul acid în proteine simple și acizi nucleici de tipul acidului dezoxiribonucleic (denumit și acid tuberculinic); ele sînt, de asemenea, agenți puternic chimiotactici pentru leucocite.

3. *Tuberculopolizaharizii* fac parte integrantă din aproape toate componentele bacilare. Se cunosc pînă acum peste 8 poli-

zaharizi, legați fie de lipide, fie în asociație cu acizi nucleici, fie, în fine, de proteine. Pot fi extrași din corpii microbieni, dar difuzează și în mediile de cultură. De constituția lor pare să fie legată specificitatea de tip a germenilor. Au caracter de haptenă (precipită cu antiserul corespunzător), nu sînt toxici, nu generează leziuni specifice, nu sensibilizează animalul nou și nu manifestă decît o slabă activitate tuberculinică. Prezintă proprietăți chimiotactice pozitive pentru leucocite. Absorbiți pe hematii normale, le fac aglutinabile de către serurile specifice corespunzătoare (hemaglutinare). Astfel cuplați, determină la animal elaborare de anticorpi specifici (funcție antigenică). Este probabil că fracțiunea polizaharidică a bacilului tuberculozei este comună cu a bacilului leprei umane, întrucît complexul „hematie-polizaharid'', în contact cu seruri provenite de la leproși indemni de tuberculoză, determină aglutinarea hematiilor sensibilizate cu el (C. C. Oprescu).

În general, compoziția chimică a micobacteriilor variază de la un tip la altul, depinzînd în mare măsură de compoziția mediului de cultură și de vîrsta culturilor.

Echipamentul enzimatic al micobacteriilor este format din exo- și endoenzime. Exoenzimele (amidaze de tipul asparaginazei, aspartazei și ureazei, lipaze și catalaze) variază în raport cu tipul micobacteriei și sînt mai bogate la tipul uman (C. Ionescu-Mihăiești și colaboratorii).

Structura antigenică. Nu s-au putut pune în evidență deosebiri imunologice nete între diferitele tipuri de micobacterii, în sensul unei diferențieri serologice de tip. Totuși, prin reacții de aglutinare, de fixare a complementului și după absorbția aglutininelor, unii autori au putut distinge *4 grupuri antigenice*: grupul micobacteriilor *mamiferelor*, acela al *păsărilor*, al *animalelor cu sînge rece* și al micobacteriilor *saprofite*. Prin absorbția aglutininelor s-a putut pune în evidență existența unui antigen comun tipurilor uman, bovin și aviar, acesta din urmă posedînd și un antigen propriu. Tipul murin nu se deosebește serologic de cel uman și de cel bovin. Cercetări recente par să arate că specificitatea de *grup* este determinată de *polizaharizi*, iar aceea de *tip* de *tuberculoproteine*.

Antigenul fixator de alexină este o haptenă lipoidică comună bacililor de tip uman și bovin; el se află în fracțiunea extractibilă cu metanol și este de natură fosfolipidică sau, mai precis, este format din săruri de magneziu ale acizilor fosfatidici. Prin injectarea la animal de bacili bovini (colonii rugoase) se obțin două feluri de anticorpi: unii care fixează complementul în prezența lipoizilor bacilari, și alții care îl fixează în prezența polizaharizilor. Coloniile netede ale aceluiași tip de germeni determină apariția unui anticorp care fixează complementul în prezența numai a antigenului proteinic al bacililor bovini, nu și în acela provenit de la bacilii de tip uman.

Lipsa specificității face posibilă imunizarea încrucișată cu un tip față de alt tip: astfel, cu bacili de origine bovină (cum este vaccinul B.C.G.) se poate imuniza activ față de bacili virulenți de tip uman.

Caractere de patogenitate. *Virulența* micobacteriilor, adică capacitatea lor de a asimila, sintetiza și elabora substanțe cu acțiune de alterare a celulelor organismului gazdă, pe seama căruia celula bacteriană se multiplică activ, este o proprietate variabilă cu tipul de micobacterie și cu organismul parazitat. Aprecierea ei se face în general prin inocularea la animalul sensibil a unor doze de germeni determinate precis. Animalul de elecţie pentru determinarea virulenţei micobacteriilor este cobaiul. Gradul de virulenţă este dat, fie de durata medie de supravieţuire a animalului după inocularea unei doze date de germeni, fie de intensitatea medie a leziunilor viscerale (,,indicele de tuberculizare''), la un anumit stadiu de evoluţie a infecţiei. Determinarea lui necesită deci prepararea unor doze bine definite de germeni infectanţi. În acest scop trebuie obţinute suspensii omogene de bacili tuberculoşi, a căror greutate pe unitate de volum să fie binecunoscută.

În ce priveşte natura factorului răspunzător pentru calităţile de virulenţă a corpului bacilar, aceasta ar fi condiţionată de o substanţă lipidică prezentă la formele virulente (care se dezvoltă cordiform în mediile de cultură), care lipseşte la acele avirulente şi care a fost denumită ,,cord-factor'' (Bloch). Cord-factorul aparţine grupului de ceruri bacilare extractibile cu eter de petrol şi alte hidrocarburi uşoare şi are — în stare pură — proprietatea de a agrava evoluţia infecţiei tuberculoase experimentale a animalului tuberculos la care este injectat.

Virulenţa conferă micobacteriilor şi unele proprietăţi particulare constatabile *in vitro*. Astfel, micobacteriile virulente inhibează migrarea leucocitelor polinucleare, iar în culturi de monocite ele se multiplică mult mai activ, exercitînd asupra monocitului parazitat o acţiune citotoxică şi citolitică mult mai puternică decît cele slab virulente sau avirulente.

Pe lîngă proprietatea de a genera leziunile specifice, corpii bacilari ai micobacteriilor vii sau moarte, şi în special ai celor patogene, determină în organism fenomene de *intoxicaţie* cu un mers cronic sau acut. În unele cazuri se întîmplă chiar ca organismul tuberculos să moară, nu din cauza marii extensiuni a leziunilor distructive tisulare, ci prin marasm fiziologic cu aspect de toxemie sau de şoc tardiv. Astfel, cobaii şi iepurii injectaţi pe cale subcutanată sau intravenoasă cu *corpi bacilari omorîţi* prezintă o stare de caşexie progresivă, care merge pînă la moartea animalelor. Un efect asemănător se obţine şi prin injectarea de *extracte acetonice*. Pe de altă parte, încă de mult se cunoştea aşa-numita ,,boală a filtratelor'', care poate fi provocată prin injectarea, la animalul nou, de filtrate de culturi bacilare bătrîne, lipsite de corpi microbieni, şi caracterizată printr-o scădere accentuată a tonusului muscular şi caşexie, urmate adesea de moarte, fără prezenţa de leziuni specifice în organe. Toate aceste efecte sînt datorite unei *componente toxice* netuberculogenice, capabile să provoace o intoxicaţie acută fără sensibilizare alergică şi fără generare de leziuni specifice (pneumonie ,,albă''). Dar pînă foarte recent, această componentă rămăsese neidentificată. În 1955, o asemenea componentă a putut fi izolată (R. I. Dubos) din bacilii tuberculoşi tineri, extrasă cu monoclorbenzen, sub forma unei *ceri* galbene, corespunzînd la 1% din greutatea iniţială a corpilor bacilari. Această fracţiune, denumită de autor ,,*fracţiunea a 7-a*'', determină la animal (şoarece) moartea acestuia, precedată de o importantă pierdere în greutate, paralizie a trenului posterior, a muşchilor respiratori şi uneori de masive hemoragii pulmonare. Concomitent însă, cercetările lui C. Ionescu-Mihăieşti şi colaboratorii au arătat că şi fracţiunile de natură *proteică* (tuberculoproteinele difuzibile) manifestă proprietăţi toxice pentru animalul nou. Toxicitatea primară a *tuberculoproteinei* se traduce printr-o intoxicaţie gravă, mergînd pînă la moartea animalului în decurs de 24 de ore, şi în unele cazuri — cînd acţiunea toxică se manifestă mai tardiv — moartea este precedată de caşexie, leucopenie, alterări degenerative ale granulocitelor, tulburări de coagulare şi modificări ale proteinelor serice. La animalele moarte cu intoxicaţie acută, plămînul, ficatul şi rinichiul prezintă alterări de şoc, iar la cele moarte mai tardiv se observă leziuni de tip degenerativ, sclerogen. Este însă greu, deocamdată, de precizat în ce măsură sînt responsabile de aceste efecte toxice tuberculoproteinele difuzibile sau fracţiunile de natură lipidică.

Infecţia la om. Specia umană este, în comparaţie cu celelalte specii ale regnului animal şi în special cu acela din clasa mamiferelor, o specie *relativ rezistentă* faţă de infecţia tuberculoasă. Dacă se are în vedere răspîndirea bacililor tuberculoşi în natură, ca şi numărul mare de indivizi care se infectează sigur la un moment dat în cursul vieţii, procentul de îmbolnăviri clinice şi cel de decese prin tuberculoză este relativ redus. Disproporţia însemnată dintre numărul infectaţilor şi acela al îmbolnăvirilor traduce o „rezistenţă naturală" a speciei umane faţă de „tuberculoza-boală" şi marea ei toleranţă pentru „tuberculoza-infecţie".

Calea de acces a bacililor în organism este, în marea majoritate a cazurilor, cea *aeriană* (respiratorie), de unde şi frecvenţa precumpănitoare a localizărilor pulmonare. În acest caz, bacilii ajunşi în parenchim determină la nivelul alveolelor pulmonare procesul inflamator caracteristic leziunilor tuberculoase, care debutează, în cazul *primoinfecţiei*, cu apariţia „*complexului primar*" format din „şancrul de inoculare", „adenopatia satelită". Atingerea primitivă a parenchimului (alveolelor), şi în mod secundar a ganglionilor sateliţi, a fost verificată în mod constant, de la Parot şi pînă astăzi.

Calea digestivă, considerată de unii (Behring, Calmette etc.) ca principala cale de contaminare a omului, are în realitate un rol redus în infectarea naturală.

În ce priveşte celelalte căi (cutaneo-mucoasă, conjunctivală, amigdaliană, genitală etc.), rolul lor în diseminarea pe cale naturală a infecţiei tuberculoase la om este foarte redus.

Leziunile specifice, provocate de bacilul tuberculos în organismul sensibil, îmbracă o mare varietate de forme şi aspecte, în funcţie de proprietăţile patogene ale germenului, pe de o parte, şi de calităţile terenului pe care va evolua infecţia, pe de altă parte.

Leziunea primitivă este un proces *alterativ* inframicroscopic, care constă în perturbări citochimice ale metabolismului („*leziune biochimică*"). Ei îi urmează procesele lezionale micro- şi macroscopice, în care — pe lîngă procesele alterative — se adaugă şi procese de *exsudare* şi *proliferare*.

În general, inflamaţia tuberculoasă îmbracă două aspecte caracteristice după structura leziunilor specifice, şi anume:

1. *Leziuni difuze*, slab delimitate, *exsudative*, care pot infiltra în ţesut („infiltraţiile tuberculoase"), ori pot ajunge la suprafaţa unui organ. Procesul exsudativ este prezent în orice leziune tuberculoasă incipientă, dar predomină în ţesuturile bogat vascularizate şi cu structură capilară (plămîni). Exsudatele se caracterizează citologic prin raritatea polinuclearelor şi marea frecvenţă a limfocitelor şi a macrofagelor.

Evoluția acestor leziuni este foarte variabilă, fie spre resorbție totală, fie spre fibroză sau scleroză, fie — în anumite condiții de sensibilizare generală a organismului — spre o necroză de coagulare foarte caracteristică : *cazeificarea*. Țesutul „cazeificat" este format dintr-o gamă de proteine degradate și de lipide îmbibate cu apă. El poate evolua extensiv spre topire sau lichefiere, eliminîndu-se la exterior și lăsînd în organ pierderi de substanță (caverne) sau suferă o deshidratare și o impregnare cu săruri calcare (calcificare).

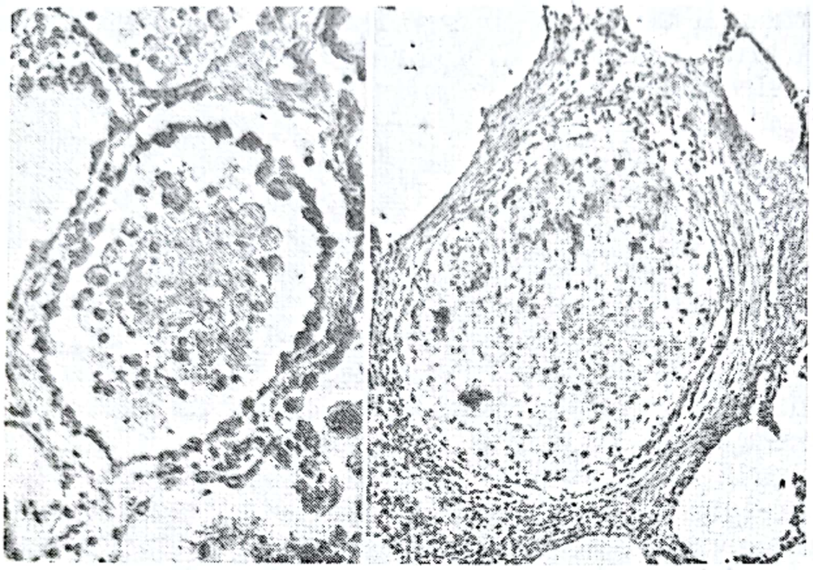


Fig. 119. — Morfologia leziunilor tuberculoase :

Stînga — leziuni de tip exsudativ (pneumonie acută tuberculoasă) : edem al septurilor alveolare ; exsudat cu fagocite mononucleare în spațiile alveolelor ; *dreapta* — leziune de tip proliferativ : tubercul epitelioid (plămîn) cu epitelioide, celule gigante, capsulă fibroasă și limfocite diseminate periferic.

2. *Leziuni circumscrise* sau *foliculare*, corespunzătoare unor procese *proliferative* sau *productive*, se dezvoltă în urma leziunilor exsudative primitive. În jurul celulelor care au fagocitat bacilii, se adună tot mai multe macrofage mobilizate, care se dispun sub formă de foliculi, elementele caracteristice leziunilor productive. Aceștia apar pe secțiuni ca niște formațiuni ovoide sau sferice, neregulate, cu prelungiri alcătuite din aglomerări de celule reticulare epitelioide, cu centrul ocupat de una sau mai multe *celule gigante* (Langhans) sub formă de plasmodii plurinucleate și înconjurate la periferie de o „coroană" de elemente limfocitoide foarte cromofile. Foliculul matur este avascularizat, ceea ce-l distinge de formațiunile nodulare nespecifice ale inflamațiilor banale. Din furnizarea mai multor foliculi rezultă granulația miliară, vizibilă macroscopic. Prin progresarea procesului apar formațiuni din ce în ce mai mari : tuberculul miliar, cu contururi neregulate și cu centrul cazeos ; tuberculul crud, de forme și dimensiuni variabile, și tuberculul inchistat, care poate atinge mărimea unei migdale cu centrul cazeificat și capsulă scleroasă periferică.

Procesele caracteristice inflamației tuberculoase prezintă deci o diversitate anatomopatologică tot atît de mare, ca și complexitatea pe care tuberculoza însăși o îmbracă pe plan clinic. Numai predominanța unuia dintre procese (alterativ, exsudativ, proliferativ) poate surveni drept criteriu în aprecierea gradului de evoluție a leziunilor specifice.

Din punct de vedere *patogenic*, leziunile elementare specifice constituie expresia interacțiunii dintre țesuturile organismului-gazdă și unele dintre componentele elaborate de celula bacteriană. În histogeneza lor, rolul cel mai important pare să revină *fracțiunilor lipidice* (fracțiunea acetonosolubilă, fracţiunea eterosolubilă sau fosfatidică, acidul ftioic, acizii graşi $\alpha-\alpha$, bisubstituiţi). Marea variaţie pe care leziunile specifice o pot prezenta este determinată de interacţiunea dintre doi factori foarte importanţi: numărul şi virulenţa bacililor, pe de o parte, şi starea de sensibilizare ori de imunitate specifică şi nespecifică a organismului-gazdă, pe de alta.

Infecţia experimentală. În condiţii naturale, puterea patogenă a micobacteriilor variază în mare măsură cu *specia animală* parazitată. Micobacteriile virulente, ca paraziţi obligatorii, manifestă o specializare a parazitismului pentru gazde adesea foarte diferite între ele din punct de vedere filogenetic. Între mamifere nu există o specie total refractară infecţiei tuberculoase, realizarea acesteia depinzînd de doza infectantă: extrem de redusă pentru unele (cobai), medie (om) sau masivă (şoarece). Adaptarea de predilecţie pentru anumite specii a creat şi între micobacterii tipurile binecunoscute, care determină — după specie — un grad evolutiv anumit al bolii. Tipul *uman* este patogen pentru om, cobai, maimuţă şi, într-o oarecare măsură, pentru şoarece, hamsteri, cîine, pisică şi papagal. Tipul *bovin*, foarte patogen pentru bovidee, iepure, cobai, maimuţă, este mai puţin patogen pentru om, şoarece, pisică etc. Tipul *aviar* îmbolnăveşte păsările domestice, iepurele, şi este mai benign pentru om, bovidee etc., pentru a fi nepatogen pentru cobai, maimuţă etc. Tipul *murin* este patogen pentru unele rozătoare (*Microtus agrestis* sau *Vole* ş.a.), iar tipurile *animalelor cu sînge rece* le afectează pe acestea (broaşte, şerpi, peşti etc.). În fine, micobacteriile *saprofite*, care pot fi găsite eventual asociate cu cele patogene în organismul unor animale nu posedă o acţiune patogenă proprie.

Dintre toate animalele, cel mai sensibil faţă de infecţia tuberculoasă virulentă este *cobaiul*. Sensibilitatea acestui animal este atît de mare, încît unii cercetători au reuşit să-l omoare cu tuberculoză generalizată prin inocularea unui singur bacil virulent, izolat în prealabil cu micromanipulatorul, iar alţii au propus ca test de virulenţă inocularea unui bacil izolat pe cale intravenoasă. Pe lîngă cobai, care rămîne reactorul principal pentru studiul patogenităţii, în laborator se mai folosesc în mod curent în acest scop *iepurele* şi *şoarecele*.

Tuberculoza experimentală a cobaiului a constituit şi constituie încă modelul clasic pentru cercetarea mecanismului patogenic al infecţiei tuberculoase. Acest animal este tot atît de sensibil faţă de tipul uman, ca şi faţă de cel bovin. Infectarea lui este posibilă pe toate căile de inoculare.

Calea subcutanată este calea de elecţie pentru provocarea bolii experimentale. Inocularea infectantă se practică, de regulă, pe faţa internă a coapsei trenului posterior al animalului; dacă inocularea infectantă a fost făcută cu bacili tuberculoşi virulenţi (tip uman sau bovin) în cultură pură şi în cantitate moderată (0,1 mg germeni), evoluţia bolii experimentale se produce astfel:

La început, timp de 1—2 săptămîni, animalul pare să-şi păstreze o stare de sănătate aparentă. După acest interval, el începe să devină apatic, apetitul scade, iar la examenul obiectiv se constată o împăstare în regiunea de inoculare. Împăstarea se accentuează evoluînd spre fluctuenţă şi apoi spre abcedare spontană. Astfel, *nodulul* ramolit şi abcedat ia forma unui ulcer *fistulizat*, cunoscut în general sub numele de *șancru de inoculare*. Șancrul are buzele deschise, nete și persistă pînă la moartea animalului. Concomitent la nivelul plicii inghinale se simt la palpare unul sau mai mulți ganglioni duri, mobili, care rulează între degete ca niște corpi străini. Această *adenopatie inghinală*, datorită hipertrofiei progresive a ganglionilor sateliți ai regiunii de inoculare, se mărește din ce în ce, pînă cînd se formează o masă ganglionară unică, care poate atinge mărimea unui sîmbure de piersică. Începînd cu săptămîna a treia sau a patra, animalul începe să slăbească vizibil, părul își pierde luciul și se zbîrlește, coastele încep să devină proeminente, flancurile se deprimă, respirația devine accelerată și febra începe să se ridice pînă peste 39,5°. Starea de cașexie progresivă, care traduce intoxicația profundă a organismului, duce, în cele din urmă, la moartea animalului între 6 și 8 săptămîni.

Autopsia unui astfel de animal, mort la limita extremă a bolii, arată că mersul acesteia se desfășoară în 3 etape:

1. Invazia sistemului limfatic; este faza cea mai caracteristică în instalarea și propagarea infecției. Bacilii introduși în țesutul celular subcutanat sînt în parte înglobați de polinucleare; acestea, încărcate de germeni și intoxicate sub acțiunea lor, îi transportă în sinusurile cavernoase ale primului ganglion întîlnit, unde leucocitele mor, iar germenii eliberați sînt fagocitați din nou de mononucleare. Prezența bacililor determină metaplazia acestora în celule gigante, apoi în tuberculi care, prin ramoliție, varsă cantități enorme de bacili în canalele limfatice eferente, diseminînd astfel infecția.

Această *diseminare limfatică* determină prinderea, rînd pe rînd, a tuturor grupelor ganglionare de pe parcurs: inghinale, promontoriene, lombare, retrohepatice, retromanubriene, axilare, traheo-bronșice și cervicale. Ganglionii afectați pot ajunge la dimensiuni enorme, prezentînd la secțiune un conținut cazeos. Urmează apoi diseminarea pe cale sanguină, care poate începe mult mai precoce decît s-ar părea, chiar din prima oră după inoculare, și care duce la cea de-a doua fază din evoluția infecției.

2. Invazia viscerelor. *Splina* se hipertrofiază rapid, ajungînd la dimensiuni enorme, devine congestivă și apoi hemoragică, friabilă, cu suprafața neregulată, uneori boselată. Ea apare ca un mozaic, avînd diseminate pe suprafața ei granulații caracteristice, la început fine și puțin numeroase, care evoluează spre granulații din ce în ce mai mari, galben-alburiu, neproeminente, greu de separat de restul parenchimului splenic și rău delimitate. Pe măsură ce cresc și se întind, ele confluează în mase din ce în ce mai compacte, sub formă de plaje cazeoase, care ajung să cuprindă toată masa organului. *Ficatul* suferă și el un proces analog, dar de obicei mai puțin intens. El este adesea afectat mai mult de un fel de „ciroză tuberculoasă", în care predomină procese adenomatoase de reparație, însoțite de ascită. Mult mai frecvent se constată însă procese de degenerescență galbenă avansată. *Rinichii* rămîn în general indemni, sau se prind foarte tîrziu și relativ discret.

3. Invazia plămînilor este tardivă; o dată prinși, ei prezintă la suprafață mici granulații cenușii diseminate, care evoluează spre tuberculi din ce în ce mai mari, avînd centrul alb și periferia cu as-

pect hialin, pe un fond de parenchim roșu închis, hepatizat. Între ei, grupele ganglionare traheo-bronșice sînt mult mai hipertrofiate și cazeificate.

Celelalte organe, aparținînd aparatului genito-urinar, digestiv, ca și glandele suprarenale, peritoneul, rămîn în general indemne.

Infecția provocată pe cale subcutanată este aceea care convine cel mai bine pentru determinarea *„gradului de tuberculizare”* a animalului, determinare care se folosește curent în cercetările asupra metodelor de vaccinare și de tratament cu tuberculostatice. Gradul de tuberculizare se exprimă prin coeficienți care arată stadiul de extensiune, la un moment dat sau la sfîrșitul evoluției bolii experimentale, a leziunilor specifice la nivelul: ganglionilor, splinei, ficatului și plămînilor. Suma coeficienților găsiți la nivelul acestor organe reprezintă *indicele mediu de tuberculizare* a animalului.

Calea intraperitoneală duce la moartea animalului după aproximativ o lună de la inoculare, prin peritonită tuberculoasă. La autopsie se vede marele epiploon transformat într-o masă alungită, cordiformă, neregulată și voluminoasă, de consistență scleroasă și presărată cu granulații și noduli cazeificați, adesea aderent de splină. Peritoneul parietal și visceral este de asemenea presărat cu granulații și tuberculi și conține lichid. Ganglionii rămîn indemni, iar splina și ficatul sînt prinse, ca și în infectarea pe cale subcutanată. Inocularea pe cale peritoneală nu este de recomandat pentru injectarea de produse patologice în scop de diagnostic, dat fiind riscul mare de infecție secundară cu germeni de asociație, care omoară rapid animalul prin peritonită acută.

Calea intravenoasă este foarte severă, ducînd la o diseminare rapidă și masivă, de tip granulic; inocularea directă în inima stîngă face ca procesul să devină și mai acut, pe cînd în cea dreaptă duce la o localizare pulmonară. Participarea ganglionară este redusă.

Calea intradermică determină apariția, în regiunea injectată, a unui nodul care se dezvoltă progresiv, se necrozează din centru spre periferie și se ulcerează, persistînd pînă la moartea animalului. Participarea ganglionară este importantă și generalizarea infecției se face ca la inocularea subcutanată.

Calea intrapulmonară se poate realiza pe cale transtoracică, pe cale intratraheală sau prin inhalare de aerosoli conținînd bacili. Se determină astfel o bronhopneumonie fibro-catarală care evoluează spre cazeificare însoțită de o importantă hipertrofie a ganglionilor traheo-bronșici. Inhalarea pe cale aeriană de suspensii fine paucibacilare poate duce la localizări tardive extrapulmonare. Calea intratraheală este cea mai fidelă.

Calea intraganglionară constă în inocularea directă într-un ganglion din lanțul cervical inferior (metoda Ninni). Este interesantă pentru precocitatea răspunsului (după o săptămînă) și prin posibilitatea de a se inocula chiar produse ușor suprainfectate (ganglionii distrugînd flora de asociație).

Celelalte căi (subarahnoidiană, intrapleurală, conjunctivală, orală) sînt rar folosite.

Rezultă deci că toate căile de inoculare provoacă la cobai, în mod inevitabil și constant, moartea animalului prin generalizarea infecției pe cale limfatică și hematogenă.

Tuberculoza experimentală a iepurelui diferă de aceea a cobaiului, dar este interesantă, întrucît se apropie mai mult de tuberculoza umană (localizare de elecţie pulmonară). Acest animal este rezistent faţă de infecţia cu bacili de tip uman, dar extrem de sensibil la aceea cu bacili de tip bovin şi aviar. Diseminarea infecţiei nu urmează căile limfatice, ci se face pe cale hematogenă. Ca şi la om, şi spre deosebire de cobai, prin generalizarea infecţiei cu tipul bovin se pot obţine localizări metastatice în toate organele (leziuni osteo-articulare, oculare, genitale, intestinale etc.). Dar infectarea pe diferite căi imprimă bolii moduri de evoluţie diferită.

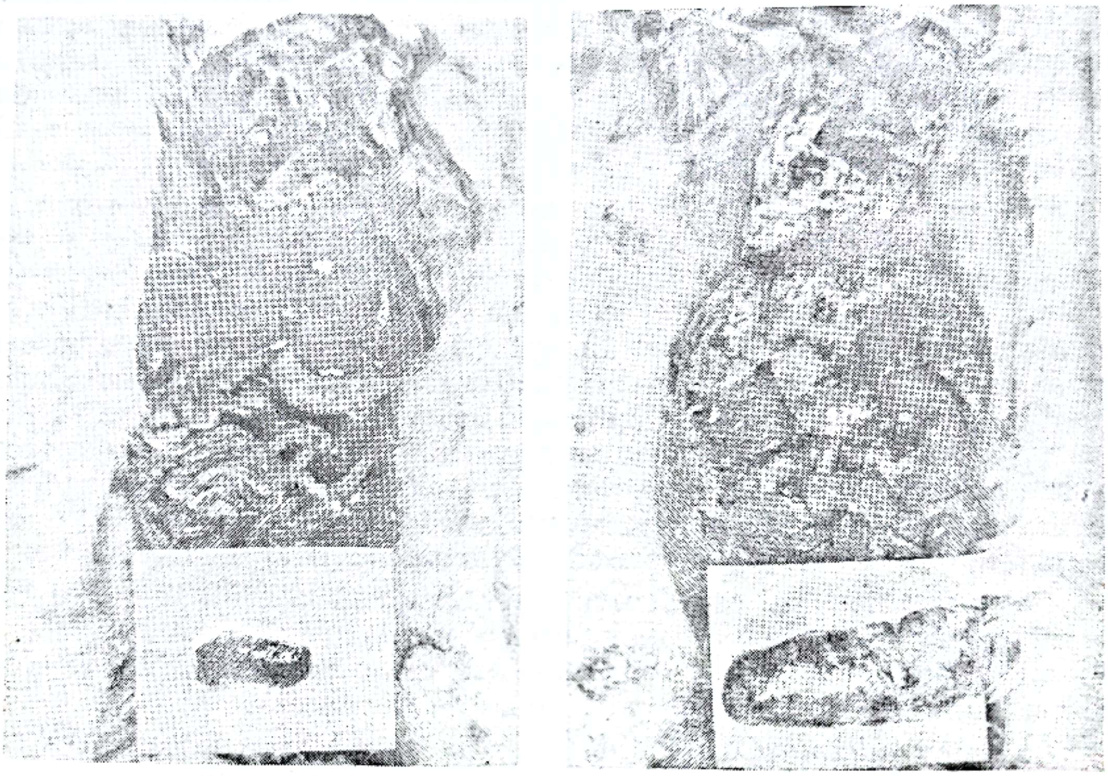


Fig. 120. — Tuberculoza generalizată a cobaiului : *stînga* — martor normal ; *dreapta* — cobai infectat.

Calea intravenoasă este calea de elecţie pentru conferirea infecţiei generalizate. Cu tipul bovin îmbracă totdeauna un caracter acut, care duce la moartea animalului prin diseminare hematogenă de tip granulic. Cu doze infectante extrem de mici se obţin numai tuberculi pulmonari care, uneori, au tendinţă la regresiune spontană. Infecţia cu tipul uman este discretă, abortivă, cu tendinţă la vindecare spontană, ceea ce face posibilă diferenţierea netă dintre cele două tipuri. Inocularea de bacili aviari în doză mare determină o infecţie acută, cu mers rapid fără leziuni vizibile macroscopic, dar cu numeroşi bacili în organe şi o hipertrofie hepato-splenică considerabilă : *tuberculoza de tip Yersin.*

Calea intrapulmonară duce la instalarea de pneumonii cazeoase, iar cu doze mari se obţin formaţiuni cavitare asemănătoare cavernelor din ftizia umană. Cu doze foarte mici infecţia devine cronică, uneori chiar abortivă.

Calea subcutanată provoacă o infecţie benignă cu bacili de tip uman şi mortală cu tipul bovin. Tipul uman realizează o boală discretă, deseori abortivă. La locul de inoculare apare de regulă un abces local, care nu se deschide, evoluînd fără participare ganglionară. Pe plămîni pot apărea mici tuberculi diseminaţi, splina şi ficatul rămînînd indemne. Cu tipul bovin infecţia devine severă, mortală chiar cu doze infectante mici. Acelaşi rezultat se obţine şi pe cale intradermică. Celelalte căi (intracerebrală, intraoculară etc.) sînt mai rar folosite.

Tuberculoza experimentală a maimuţelor evoluează totdeauna spre generalizare urmată de moarte, oricare ar fi calea de inoculare, acest animal fiind tot atît de sensibil ca şi cobaiul; spre deosebire de acesta, maimuţa face cu mult mai frecvent tuberculoză spontană. Localizările cele mai frecvente sînt cele pulmonare şi digestive, tipurile de bacili umani şi bovini fiind la fel de patogene.

Tuberculoza experimentală a şoarecelui alb, mult cercetată în ultima vreme, este folosită astăzi în mod curent pentru testarea protecţiei conferite de diferite vaccinuri sau chimioterapice faţă de infecţia virulentă de probă. Calea de elecţie este cea intravenoasă (una din venele caudale) care duce, după 2–6 săptămîni, în funcţie de doză, la o tuberculoză predominant pulmonară şi cu leziuni discrete dar foarte bogate în bacili, în splină şi într-o mai mică măsură, în ficat. Doza optimă pentru infectare este de 1–2 mg bacili intravenos. La animalul mort *in extremis* plămînii prezintă foarte numeroşi noduli mari, ale căror dimensiuni şi frecvenţă pot servi la stabilirea unui „indice de tuberculizare” a animalului infectat. De remarcat că chiar atunci cînd leziunile pulmonare au devenit foarte strînse şi extrem de bogate în bacili, ele nu prezintă caracterul de specificitate binecunoscut, de tip giganto-celular şi cazeificant, ci rămîn cu aspect de inflamaţie nespecifică. Ele apar doar sub forme de „noduli cu celule spumoase”, traducînd reactivitatea particulară a acestui animal faţă de micobacterii. Celelalte căi de inoculare rămîn practic neeficiente.

Celelalte specii animale prezintă o mai mică importanţă practică pentru studiul experimental al infecţiei tuberculoase.

Reacţiile imunobiologice. *Alergia şi imunitatea în infecţia tuberculoasă.* Modificările reacţionale caracteristice care se instalează după contactul dintre micobacterii şi organism se traduc printr-o serie de proprietăţi noi, care lipsesc cu totul la organismul indemn (neinfectat); aceste modificări au fost cercetate amănunţit în tuberculoza experimentală a cobaiului şi verificate în clinica umană. Ele constau esenţial în următoarele:

Dacă se inoculează unui animal sensibil şi indemn (cobai) bacili tuberculoşi virulenţi, el face invariabil boala experimentală acută sau cronică după doza infectantă, şi care evoluează spre moarte prin generalizarea leziunilor. Dacă însă după o asemenea *primoinfecţie* animalul primeşte, pe cale subcutanată sau intradermică, o nouă inoculare virulentă, reacţia lui faţă de această *reinfecţie* se deosebeşte cu totul de reacţia faţă de infecţia primară. Foarte curînd după inoculare (12–24 de ore) regiunea reinoculată devine lividă şi edemaţiată, apoi violacee şi cu aspect hemoragic, evoluînd rapid spre necroză. Pielea necrozată se separă de ţesutul viu şi se elimină, lăsînd în loc o plagă deschisă, cu buzele îngroșate și fundul plan, cu tendință la vindecare rapidă și fără participare ganglionară. Așadar, reacția locală la reinfecție, prin caracterul ei de violență, precocitate și rapiditate a evoluției, se deosebește total de nodulul și șancrul de inoculare cu evoluție lentă, fără tendință la vindecare și cu participarea ganglionilor sateliți, care evoluează pînă la moartea animalului. Acest fenomen a fost pentru prima oară pus în evidență de Koch și a primit de aceea numele de *fenomenul Koch* (1891).

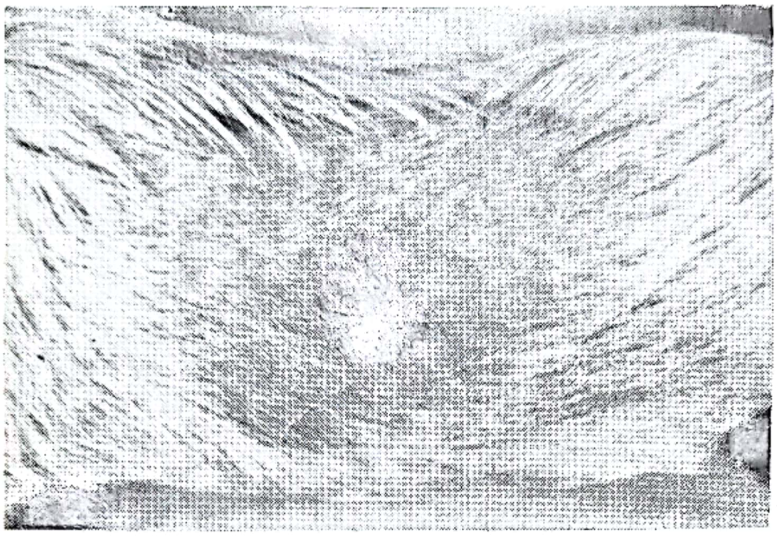


Fig. 121. — Fenomen Koch.

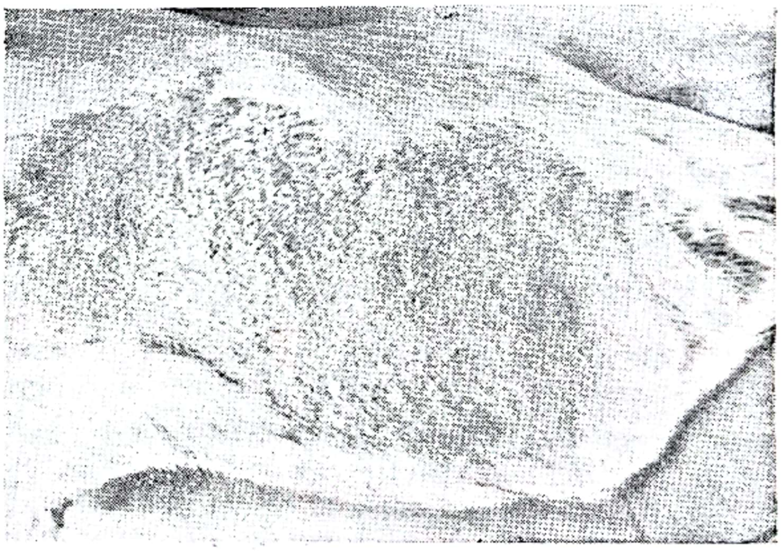


Fig. 122. — Reacții de tip tuberculinic (test Mantoux) la cobai (concentrații descrescînde), 48 de ore de la injecția intradermică.

Prin caracterele lui particulare, acest fenomen traduce o serie de *proprietăți noi*, pe care organismul reinfectat le cîștigă în urma primoinfecției și între care două sînt deosebit de importante: *hipersensibilitatea față de corpii microbieni*, pe de o parte, și *rezistența față de bacilii de reinfecție*, pe de alta.

Dar organismul tuberculizat nu manifestă acest mod de a reacționa diferit de cel indemn, numai față de corpii microbieni de reinfecție, ci și față de unele produse de metabolism ale acestora și în special față de tuberculoproteinele difuzibile și de tuberculină.

Tuberculina „veche, a lui Koch" (*Alt Tuberkulin* — A. T., *Old Tuberculin* — O.T.) este produsul care se obţine din filtratele de cultură pe medii lichide (bulion glicerinat, Sauton), pe care s-au dezvoltat bacili tuberculoşi, după omorîrea lor prin căldură, urmată de evaporarea filtratelor obţinute pe baia de apă (80°), pînă la a zecea parte din volumul iniţial. Produsul concentrat final este un lichid siropos, cu miros de micşunele, şi foarte stabil (la întuneric şi la rece). Injectarea pe orice cale a acestei substanţe rămîne fără efect la organismul indemn. La cel infectat însă tuberculina determină apariţia unor reacţii foarte caracteristice, rezultate ale unei stări de „sensibilizare specifică" dobîndită, care imprimă un mod de reacţie schimbat. De la Von Pirquet încoace, această stare de sensibilizare este cunoscută sub numele de *alergie* (stare alergică, sensibilizare alergică).

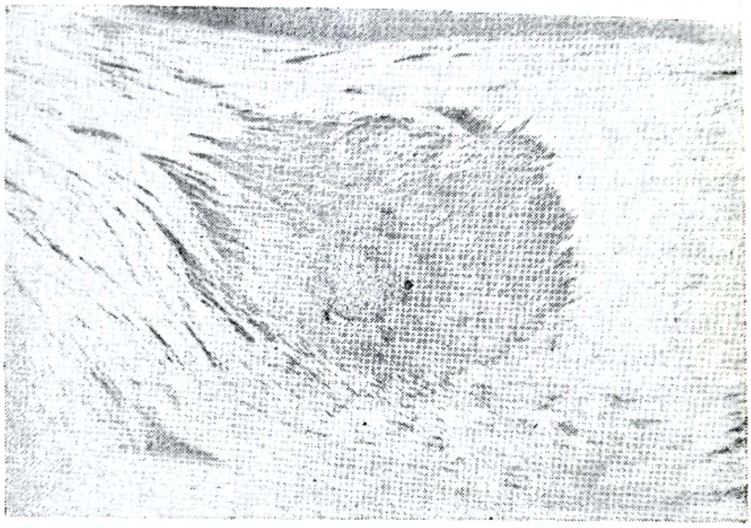


Fig. 123. — Reacţia Mantoux intens pozitivă la cobai (48 de ore).

În mod practic, punerea în evidenţă a sensibilizării alergice se face prin injectarea unei doze de tuberculină brută sau diluată şi urmărirea reacţiei astfel provocate. *Reacţia la tuberculină*, care nu dă nici un fel de modificări vizibile la organismele care n-au venit niciodată în contact cu bacilul tuberculos (anergie tuberculinică), determină la cel infectat reacţii specifice *locale*, cu tumefacţie congestivă la locul de injecţie, *focale* cu congestie intensă la nivelul focarelor preexistente, şi *generale*, care se traduc prin hipertermie, hipotensiune, congestii viscerale şi uneori chiar prin moarte, datorită aşa-numitului *şoc tuberculinic*.

Reacţia locală la tuberculină este aceea care serveşte în mod practic drept test biologic al infectării, dat fiind că starea de alergie conferită de infecţie este prezentă, atît în cazurile de boală evolutivă, cît şi acelea de infecţie latentă, clinic inaparentă; aceasta din urmă poate dura ca atare toată viaţa, netrădîndu-se decît prin reactivitatea alergică pozitivă.

În practică, explorarea reactivităţii alergice se face prin reacţia cutanată pe care o provoacă tuberculina în contact cu dermul. Sensibilitatea tegumentelor omului alergic la tuberculină este foarte mare, de aceea injectarea aceasta se face, de regulă, în diluţii foarte mari (1 :10 000—1 : : 1 000 000 şi mai mult). Sensibilitatea dermică a animalelor (exemplu cobai) este cu mult mai redusă, ceea ce impune injectarea de soluţii mult mai concentrate de tuberculină (1 :5—1 :20). Doza-test de tuberculină este calculată pe presupunerea (foarte aproximativă) că 1 ml de tuberculină brută ar conține 1 000 mg (1 g) de principiu activ. În realitate, proteina activă din tuberculină constituie numai o mică parte din aceasta, restul fiind format din peptonă, glicerină și diverse săruri minerale. Întrucît prezența acestor substanțe nespecifice poate determina și reacții dermice nespecifice, pentru determinarea cu precizie a reactivității alergice se folosește o tuberculină purificată, care conține în soluție numai tuberculoproteina activă specifică. O asemenea preparație, care servește și ca standard internațional pentru titrarea activității tuberculinice a unei tuberculine oarecare, este așa-numitul P.P.D al Institutului de seruri din Copenhaga.

Această preparație conține o soluție de tuberculoproteină purificată, titrînd 1 mg substanță activă pe mililitru. O doză (unitate) reacțională este dată de reacția obținută pe un derm alergizat prin injectarea intradermică a 0,1 ml din diluția 1 :5 000 (ceea ce revine, ponderal, la injectarea a 1 :50 000 mg proteină activă).

Căile de administrare a tuberculinei pentru depistarea alergiei sînt multiple, dar în practică se folosesc de regulă numai 3 : *subcutanată, cutanată* și *intradermică.*

Calea subcutanată a fost întrebuințată pentru prima oară chiar de Koch, pentru a injecta așa-numita-i „limfă" (tuberculină brută) în scopuri terapeutice. Dar reacțiile generale (febră, cefalee, curbatură) și focale (congestia eventualelor focare) fiind foarte violente și putînd duce la accidente grave (hemoptizii, reactivări de focare latente), au făcut să fie repede părăsită în practică. Ascensiunea termică pe care o determină este de regulă proporțională cu doza de tuberculină injectată, putînd astfel servi, la animal, pentru aprecierea intensității alergiei.

Cutireacția (reacția Von Pirquet) constă în depunerea, pe pielea scarificată în prealabil cu un vaccinostil, a unei picături de tuberculină brută. După 48 de ore, indivizii alergici prezintă la nivelul scarificațiilor o papulă eritematoasă, care poate evolua uneori pînă la necroză.

Intradermoreacția (reacția Mantoux) este metoda cea mai folosită în practică, dînd rezultatele cele mai fidele, fără inconvenientele reacțiilor precedente. Reacția constă în injectarea, strict intradermic, a 0,1—0,2 ml dintr-o diluție convenabilă de tuberculină, care în mod curent este de 1 :10 000. Dacă sînt de temut eventuale reacții prea violente (hiperergie), se începe cu injectarea unor diluții mari (1 : 1 000 000, și mai mult), mergîndu-se apoi spre concentrații din ce în ce mai mari, pînă la obținerea unei reacții net pozitive. Reacția se citește după 24 și după 48 de ore de la injectare, la lumina difuză a zilei. Aspectul ei poate fi : eritematos simplu sau eritem cu indurație (de diferite dimensiuni), nodul, papulă, flictenă și escară, după gradul de alergizare a organismului.

Intensitatea reacțiilor se notează, în general, după cum urmează :

— eritem ușor, sub 5 × 5 mm diametru — reacție negativă (—) (0);

— eritem net, cu diametrul 5—10 mm — reacție dubioasă (±);

— eritem și indurație (infiltrație), diametru 10—12 mm — reacție pozitivă (+);

— eritem și indurație (nodul, diametru 10—15 mm — reacție net pozitivă (++);

— eritem, nodul, aspect papulos sau flictenular, 15—20 mm diametru — reacție intens pozitivă (+++);

— eritem intens, nodul mare, aspect papulos-flictenular, evoluînd spre escară, diametru peste 20 mm — reacție foarte intens pozitivă (++++).

Intensitatea unei reacții la tuberculină este proporțională cu gradul de alergie, dar nu și cu gravitatea infecției. În stadiul preterminal al bolii, cînd forțele de apărare s-au prăbușit, reacția se poate negativa, trădînd starea de anergie tuberculinică a organismului. De asemenea, în unele boli debilitante (gripă, rujeolă, tuse convulsivă, febră tifoidă etc.) se poate instala o stare de anergie trecătoare, care justifică denumirea de boli anergizante care se dă acestor afecțiuni. Infecțiile tuberculoase masive ale nou-născuților se însoțesc adesea de anergii tuberculinice, trădînd un prognostic sumbru. În mod trecător, asemenea anergii pot apărea și în unele afecțiuni hepatice grave sau după intervenții chirurgicale necesitînd anestezie generală (eter). Stări asemănătoare de anergie tranzitorie pot apărea și în mod fiziologic, în anumite situații, cum ar fi în perioada premenstruală sau primul septenar după naștere (*post partum*). Unii agenți fizici cu acțiune nespecifică pot determina o stingere trecătoare a sensibilității alergice cutanate (razele ultraviolete, insolațiile, aplicațiile de sinapisme și vezicatorii etc.), care însă privesc numai teritoriile cutanate afectate de acțiunea lor.

Sensibilitatea tuberculinică poate fi atenuată și chiar făcută să dispară în mod artificial prin administrarea subcutanată de doze repetate și crescînde de tuberculină : fenomenul de desensibilizare. Astfel se poate ajunge pînă la tolerarea unei doze de tuberculină care ar fi sigur mortală pentru un organism nepreparat. Desensibilizare dobîndită în acest mod nu se poate însă obține printr-o singură injecție masivă de tuberculină și nici nu are o durată indefinită. Specificitatea reacțiilor la tuberculină, în raport cu tipul de bacili cu care s-a făcut infecția, nu este riguroasă. Astfel, omul infectat cu bacili tuberculoși de tip uman răspunde tot atît de intens față de tuberculina preparată cu tipul uman, ca și față de aceea preparată cu tipul bovin.

Reactivitatea alergică la organismul infectat nu apare imediat după contactul infectant; între momentul infecției și acela al pozitivării reacției la tuberculină (virajului) trece un anumit timp, o perioadă refractară : faza antealergică, care este cu atît mai scurtă cu cît doza infectantă a fost mai mare și cu cît virulența bacililor a fost mai accentuată. Într-o măsură mai mică ea este influențată de specia animală și de capacitatea individuală de reacție a organismului respectiv.

În general, gradul maxim de alergie cutanată se constată în cursul celei de-a patra săptămînă de la contactul infectant și durează uneori pînă la moarte. Se admite că persistența în timp a unei reacții pozitive este întreținută, fie de un focar latent endogen, fie de reinfecții mici și repetate exogene. Procentul reacțiilor pozitive crește proporțional cu vîrsta; el este nul la nou-născuți, atinge aproximativ 10% între 5 și 8 ani, 70% în jurul vîrstei de 21 de ani, spre a ajunge la 90% după vîrsta de 40 de ani.

Spre bătrînețe, o dată cu declinul fiziologic general al organismului, și reactivitatea alergică scade progresiv, uneori pînă la dispariție.

Reactivitatea alergică nu este provocată numai de contactul cu bacilii tuberculoși vii, ci și de corpii bacilari omorîți. Această sensibilizare este însă, pentru doze echivalente, mai slabă și mai puțin persistentă decît aceea conferită de germenii vii. Ea poate fi însă intensificată, dacă corpii bacilari omorîți sînt înrobați într-un amestec adjuvant (ulei de parafină sau vaselină). Prin acest procedeu se pot obține chiar reacții hemoragico-necrotice, dacă administrarea tuberculinei se face subcutanat sau intramuscular.

Cercetările de dată mai recentă par să arate că sensibilizarea alergică, o dată dobîndită prin contactul cu bacilul tuberculozei, poate persista multă vreme chiar și după dispariția germenilor din focare. Așadar, prezența de focare active sau latente nu mai este considerată ca o condiție absolut necesară a întreținerii stării de alergie, deși durata acesteia nu rămîne indefinită după sterilizarea bacteriologică completă a leziunilor.

Imunitatea antituberculoasă. Mai mult ca în oricare altă infecție, în tuberculoză noțiunea de imunitate pare foarte relativă. Evoluția foarte îndelungată a bolii, care face din tuberculoză cea mai cronică dintre boli, progresiunea ei în timp, cu perioade de exacerbări și remisiuni, arată că organismul singur este puțin capabil să opună procesului infecțios o rezistență îndeajuns de eficace pentru a opri repede și definitiv mersul bolii.

Cu toate acestea, este cunoscut de multă vreme faptul că organismul infectat rezistă mult mai bine unei noi infecții masive, decît cel neinfectat.

Numeroase cercetări experimentale au arătat că o primoinfecție conferă animalului o stare de rezistență foarte marcată față de o reinfecție, chiar dacă infecția primară a fost benignă. S-a constatat că bacilii de suprainfecție nu se mai disemineaza în organism, ci rămîn „fixați” la locul de reinoculare, unde sînt repede distruși (bacteriopexie) și eliminați pe diferite căi (hepatointestinală, renală etc.), ori dispar printr-un mecanism încă necunoscut. Modul de reacție sau intoleranța organismului suprainfectat se caracterizează deci prin localizarea, închistarea și apoi distrugerea *in situ* a germenilor de reinfecție. Rapiditatea, ca și intensitatea cu care au loc aceste fenomene depind de gradul de alergizare a animalului și de doza infectantă de bacili inoculați. Boala acestuia evoluează cu totul independent de reinfecție, el comportîndu-se ca și cum ar fi, în același timp, foarte sensibil față de bacilii de primoinfecție și foarte refractar față de cei de reinfecție.

În problema raportului dintre sensibilitatea alergică și imunitatea față de infecția tuberculoasă, cercetările au arătat că se poate disocia alergia de imunitate. Independența dintre acești doi factori poate fi pusă în evidență pe diverse căi. Astfel, animalele vaccinate la care se împiedică în mod artificial apariția alergiei (desensibilizare) sînt la fel de rezistente față de infecția virulentă, ca și cele vaccinate, dar cu alergia păstrată (C. C. Oprescu și Dora Dumitrescu). De asemenea, alergia conferită animalului nou prin tratare cu un complex alergizant, în lipsa corpilor microbieni, nu mărește rezistența la infecția virulentă (Raffel). Este cert că factorul „rezistență” depinde, în primul rînd, de anumite calități de susceptibilitate ale organismului față de germeni, cunoscute în general sub denumirea de „teren". El nu apare legat de prezența anticorpilor umorali specifici, întrucît chiar serurile cele mai bogate în asemenea anticorpi nu pot influența favorabil mersul unei tuberculoze evolutive, nici la organismele de la care provin, nici la acelea cărora le sînt transmise pasiv. Aceasta, deși serurile provenite de la bolnavi tuberculoși pot aglutina suspensiile de bacili *in vitro*, pot favoriza fagocitarea acestora, pot fixa alexina în prezența lor și a componentelor antigenice și pot precipita cu tuberculoproteinele și polizaharizii bacilari, fără însă să manifeste proprietăți bactericide sau litice.

Principalul factor al imunității antituberculoase pare să fie de natură celulară, constînd în capacitatea anumitor celule din organism (macrofagele, histiocitele) de a inhiba dezvoltarea și apoi de a distruge bacilii pe care îi fagocitează. Totodată, evoluția pe care o suferă fagocitul în elementele componente ale foliculului (epitelioide, celule gigante) are drept consecință limitarea procesului infecțios, prin circumscrierea leziunilor. Un rol important în organizarea acestei apărări tisulare revine sistemului nervos, așa cum se admite de școala sovietică (Model, 1950 ș.a.). În consecință, gradul de rezistență a unui organism față de infecția tuberculoasă ține de capacitatea organismului de a opune bacililor de invazie o barieră tisulară organizată rapid, sub formă de reacții de tip nodular. Organismele sensibile nu posedă această capacitate și răspunsul celular față de invazia tuberculoasă este întîrziat, cu caracter difuz, celulele inflamatoare nereușind să opună, în timp util, o barieră eficientă invaziei bacilare.

Tratamentul specific al tuberculozei. Bacilul tuberculozei s-a arătat în general sensibil la acțiunea bacteriostatică a unor substanțe antibiotice, naturale și de sinteză care, acționînd asupra metabolismului normal al germenului, îl modifică în așa fel, încît îi împiedică multiplicarea. El poate astfel fi mult mai ușor fagocitat și distrus de fagocite în organismul infectat. Numărul chimioterapicelor și al antibioticelor tuberculostatice este astăzi relativ mare (streptomicina, hidrazida acidului izonicotinic, acidul paraaminosalicilic, tiosemicarbazonele, cicloserina, viomicina, pirazinamida, etioniamida etc.), numărul lor crescînd neîncetat. Toate aceste tuberculostatice prezintă marele dezavantaj al rezistenței pe care bacilii o pot căpăta, cu timpul, față de acțiunea lor. Fenomenul de rezistență apare ca o consecință a contactului dintre antibiotic și germenul aflat în perioada de multiplicare logaritmică a celulei bacteriene. O dată instalată, rezistența este fixată și se transmite ereditar generațiilor următoare.

Ea implică modificări profunde privind proprietățile biochimice ale germenului care afectează toate celelalte calități ale sale: morfologice, tinctoriale, antigenice, virulența și patogenitatea etc.

Antibioticele mai însemnate cu acțiune tuberculostatică sînt:

Streptomicina izolată din actinomicetul *Streptomyces griseus*, este bacteriostatică față de bacilul tuberculos, sensibil în concentrație de 0,25–0,50 γ/ml. Are o toxicitate proprie relativ ridicată, care crește proporțional cu cantitatea administrată. Dozele uzuale sînt de 1–2 g pe zi, pe cale intramusculară. Indicația majoră o constituie granulia și celelalte forme de diseminări hematogene în faza precedentă instalării leziunilor masive cazeificate.

Acidul paraaminosalicilic (PAS). Are o putere bacteriostatică *in vitro* la concentraţii variind între 0,1 şi 0,5 γ/ml. Toxicitatea este foarte redusă, doza terapeutică variind între 12 şi 15 g substanţă pe zi, pe cale orală sau intravenoasă.

Hidrazida acidului izonicotinic (HIN, izoniazida) este cel mai activ dintre tuberculostaticele majore. Puterea tuberculostatică faţă de bacilul tuberculos (cu excepţia tipului aviar) se manifestă pînă la concentraţii de 0,02—0,05 γ/ml. Toxicitatea este foarte redusă, ceea ce permite administrarea timp foarte îndelungat. Administrarea se face pe cale orală, în doze medii de 5—10 mg/kilocorp. Indicaţiile clinice sînt foarte largi.

Etioniamida, „trecatorul" (1314 Th) sau amidazina prezintă un interes deosebit, datorită faptului că posedă o activitate tuberculostatică remarcabilă asupra bacililor tuberculoşi deveniţi rezistenţi la acţiunea hidrazidei. Are o activitate bacteriostatică *in vitro* variind între 0,6 şi 1,5 γ/ml în mediile lichide (Youmans) şi între 1,0 şi 2,5 γ/ml în cele solide (Jensen). Toxicitatea este redusă, rezumîndu-se uneori la tulburări gastrointestinale moderate. În organism, după administrarea orală a unei doze de 0,25 g substanţă, se realizează concentraţii serice utile de 10—20 γ/ml.

Diagnosticul de laborator

Diagnosticul de laborator al infecţiei tuberculoase comportă două categorii de examene: bacteriologice şi serologice.

Diagnosticul bacteriologic constă în punerea în evidenţă a bacilului tuberculos într-un produs patologic, provenit de la bolnav (spută, spălătură bronşică, puroi, urină, lichidul cefalorahidian, exsudate etc.); acesta trebuie cercetat prin două feluri de metode:

Metode microscopice: *frotiul direct* se face din produse patologice solide sau semisolide, care se întind în strat cît mai subţire şi mai omogen pe lame curate şi degresate. Frotiul întins este uscat la temperatura camerei, apoi fixat prin căldură şi colorat după metoda Ziehl-Neelsen astfel: frotiul fixat se acoperă mai întîi cu fucsină fenicată şi se încălzeşte uşor pînă la emisiune de vapori, timp de 5—10 minute; se varsă apoi colorantul, se spală cu apă de robinet şi se tratează cu acid sulfuric diluat 1 : 4, timp de 2 minute, se spală din nou, apoi se acoperă lama cu alcool 96° şi se lasă 5 minute (pînă la decolorarea frotiului). Se spală din nou cu apă şi se recolorează de fond cu o soluţie apoasă (sau alcoolică) 1% de albastru de metilen, timp de un minut. Se spală iarăşi cu apă şi se lasă să se usuce la aer, după care se examinează la microscop cu imersia. În cazurile pozitive, bacilii apar intens coloraţi în roşu, pe un fond albastru. Numărul (frecvenţa) lor nu constituie un element de prognostic; singură prezenţa lor are o valoare diagnostică. Absenţa bacililor în frotiu nu înseamnă că produsul este sigur negativ, porţiunea cercetată la examenul direct reprezentînd doar o cantitate infimă din produs (cam 1 ml dintr-un volum de 10—20 ml). În asemenea cazuri se recurge la metode speciale de tratare, prin care bacilii sînt concentraţi sub un volum foarte mic, ceea ce măreşte considerabil şansele de depistare.

Metodele de omogenizare se bizuie pe fluidificarea produsului, urmată de concentrarea germenilor. Fluidificarea este rezultatul acțiunii alcalilor sau acizilor minerali diluați care, solubilizînd fibrina, eliberează bacilii din masa care-i reține. Bacilii astfel eliberați sînt concentrați apoi sub volum mic. Metodele de omogenizare sînt numeroase (omogenizări alcaline, acide, prin etuvare, flotație etc.); dintre ele, redăm două mai simple și cu o întrebuințare mai largă în practica curentă:

Omogenizarea alcalină (cu sodă). La un volum dat de produs (spută) se adaugă 1—8 volume hidrat de sodiu 6%(după consistența produsului); se agită bine și se lasă la termostat pînă cînd se obține un aspect omogen al amestecului. Apoi, fie că se centrifughează o jumătate de oră la 3000 t/min., spălîndu-se depozitul de două ori cu ser fiziologic steril, după care se examinează, fie se neutralizează cu acid sulfuric 6% în prezența a două picături de tinctură de turnesol, în vederea însămînțării sau inoculării la animal.

Flotația (metoda de omogenizare Bobrov). Se colectează timp de 2—3 zile sputa de bolnav într-o scuipătoare sterilă. Se adaugă un volum egal dintr-o soluție 0,5% hidrat de sodiu și se agită puternic, pînă la dispariția completă a mucozităților și grunjilor. Recipientul se introduce într-o baie de apă la 60°, continuînd agitarea cîteva minute. Se adaugă apoi 2 ml xilol și cam 50 ml apă distilată. Se astupă ermetic recipientul și se agită puternic conținutul timp de 10 minute. Amestecul omogenizat se transvazează într-un balon cu gîtul lung și îngust, completîndu-se cu apă distilată, astfel ca nivelul amestecului să umple balonul, inclusiv gîtul. Se lasă în repaus cel puțin o oră. Se acoperă baia cu un geam, pînă cînd sticla ia temperatura băii; în acest moment, se așază pe ea lame degresate, numerotate. Cu o pipetă Pasteur, prevăzută cu pară de cauciuc, se prelevă din stratul cremos, format deasupra amestecului 1—2 picături care se depun pe lamă, unde sînt lăsate să se usuce. După uscare, se repetă operația, suprapunîndu-se astfel pînă la completa epuizare a stratului cremos. Aceste picături multistratificate sînt degresate prin tratare cu eter, după care sînt fixate la flacără și colorate cu metoda Ziehl-Neelsen.

Metode biologice. Insămînțarea pe medii de elecție mărește considerabil șansele de depistare a bacililor în produsele paucibacilare.

Ca medii de cultură se recomandă:

Mediul Loewenstein care se prepară în modul următor:

Se dizolvă la cald, într-un recipient steril:

Fosfat monopotasic	1 g
Citrat de sodiu	1 g
Sulfat de magneziu	1 g
Asparagină	3 g
Glicerină neutră (bidist. 30°B)	60 g
Apă distilată	1 000 ml.

Se autoclavează la 100° timp de 2 ore (această soluție-mamă se poate conserva indefinit la rece, fără a se altera). Din soluție se iau, în mod steril, 150 ml într-un balon de 500 ml cu perle (Pyrex-steril) și se adaugă 6 g făină de cartof (amidon) și 12 g glicerină neutră sterilă. Se agită bine cu perlele iar balonul se ține o oră la 100° (sau 15 minute la 100° și o oră la 56°). În alt balon steril cu perle se pun între timp, în mod steril, 4 ouă proaspete întregi, plus gălbenușul unui al cincilea, și se agită cu perlele. Se adaugă apoi în mod steril, agitînd continuu, conținutul primului balon. Se continuă viguros agitarea, apoi se mai adaugă 5 ml dintr-o soluție apoasă 2% verde malahit. Se amestecă totul bine și se filtrează prin pîlnie cu tifon steril, repartizînd în tuburi 160×16, cîte 5—6 ml mediu de fiecare tub. Tuburile se pun înclinate pe nisipul unei cutii de coagulare pînă se coagulează, apoi se țin cîte 2 ore pe zi, timp de 2 zile, în cutia de coagulare la 80—85°, după care se închid ermetic și li se face controlul sterilității. Se păstrează bine timp de 2 — 3 săptămîni la gheţar (4°).

Mediul Jensen este folosit în mod curent pentru scopuri de diagnostic bacteriologic, întrucît a dat cele mai bune rezultate în ce privește sensibilitatea. Este însă necesară respectarea riguroasă a tehnicii de preparare expusă mai jos.

Prepararea acestui mediu se face timp de două zile consecutiv. În prima zi se prepară, într-un pahar Erlenmeyer de un litru, următoarea soluție :

Fosfat monopotasic	2,4 g
Sulfat de magneziu	0,24 g
Citrat de magneziu	0,60 g
Asparagină	3,60 g
Glicerină neutră	12 ml
Apă bidistilată	600 ml

Întrun alt balon Erlenmeyer steril se pun 30 g feculă de cartof ; ambele pahare sînt sterilizate timp de 2 ore la autoclav cu capacul deschis (100°).

În dimineața zilei următoare, se curăță cu grijă două duzini de ouă proaspete, care se țin o jumătate de oră într-o soluție 5% de sodă după care sînt spălate cu apă și ținute din nou zece minute într-un amestec de apă și alcool. Ouăle sînt apoi șterse cu comprese sterile, trecute rapid prin flacără și sparte într-o capsulă de porțelan sterilă, de unde sînt vărsate într-un balon Erlenmeyer, așa ca să acopere volumul total de un litru ouă, și sînt bine agitate cu perle sterile (într-un balon Erlenmeyer de cel puțin 2 l).

Soluția cu săruri se varsă în mod steril în balonul Erlenmeyer cu feculă și amestecul se ține un sfert de oră într-o baie de apă la fierbere, agitînd, pentru o omogenizare cît mai perfectă, apoi este pusă o oră într-o baie la 56°. Amestecul este turnat peste ouă și se adaugă 20 ml dintr-o soluție 2% verde malahit. Se amestecă prin agitare cu perle, apoi se trece prin pîlnie cu tifon steril și se repartizează cîte 6 ml în tuburi sterile 160×16. Tuburile sînt puse la coagulat în poziție înclinată, timp de o jumătate de oră la 85°.

După coagulare, mediul este galben deschis, dar cu timpul păstrării devine ușor verzui. Vom căuta să ne dăm seama, după culoare, dacă ouăle au fost bune și dacă reacția mediului este convenabilă (pH optim = 6,9). Tuburile se păstrează 2 zile cu dopul de vată, la adăpost de lumină, pentru ca să se evaporeze apa de condensare, după care sînt capușonate. Apoi se păstrează la gheţar (+4°), fiind utilizabile timp de maximum 3 săptămîni de la data preparării. În asemenea condiții, sensibilitatea acestui mediu pentru detectarea bacililor tuberculoși din produsele patologice — chiar a celor paucibacilare — nu este întru nimic inferioară inoculării la cobai.

Însămînţarea produselor contaminate secundar se face după prealabilă tratare cu sodă. Apariţia coloniilor are loc după 10—15 zile şi în general pînă la 3 luni, uneori şi mai tîrziu. Vegetarea bacililor hidrazdo-rezistenţi poate întîrzia mai multe luni. Culturile trebuie examinate cel puţin la fiecare două săptămîni.

Mediul Sauton. Se dizolvă la cald, într-un balon de 2 litri :

Asparagină	4	g	
Acid citric	2	g	
Fosfat bipotasic	0,50	g	
Sulfat de magneziu	0,50	g	
Citrat feric amoniacal	0,05	g	(se adaugă la urmă)
Glicerină neutră (bidistilată)	60	g	
Apă distilată	1000	ml	

se neutralizează cu cîteva picături de amoniac pur pînă la pH 7,2, se repartizează şi se sterilizează un sfert de oră la 115°. Însămînţarea se face depunînd la suprafaţa mediului un fragment de văl (3—5 mm), a cărui dezvoltare începe să devină vizibilă după aproximativ o săptămînă.

Mediul Youmans. De asemenea sintetic, folosit în special pentru testarea micobacteriilor la antibiotice, este preparat din :

Asparagină	5	g
Fosfat monopotasic	5	g
Sulfat de potasiu	0,5	g
Glicerină neutră	20	g

Aceste substanţe se dezvoltă în ordinea indicată, în 1000 ml apă distilată, se ajustează pH la 7,0 cu o soluţie de sodă 40%, apoi se adaugă :

Citrat de magneziu	1,5	g

se sterilizează la autoclav 20 de minute la 115°, apoi se adaugă aseptic plasmă citratată umană sau ser normal de bou, aşa încît să se obţină o concentraţie finală de 10%, şi se repartizează steril.

Un progres însemnat în prepararea de medii sintetice albuminoase, permiţînd cultivarea de bacili din inocule paucibacilare (de ordinul $\leqslant 10^{-7}$ mg), a fost realizat de Dubos, prin introducerea la un mediu sintetic de bază a unor substanţe care accelerează creşterea germenilor, făcîndu-i totodată să se dezvolte dispersat şi omogen (în profunzime), în tot cuprinsul mediului.

Aceste substanţe sînt :

— un ester al acidului oleic (derivat polioxialkilenic al monooleatului de sorbitan), cunoscut sub numele comercial de *Tween 80*, solubil în acelaşi timp în apă şi în grăsimi, care permeabilizează capsula adipoceroasă a bacilului, uşurînd astfel asimilarea elementelor în soluţie din mediu ; concomitent, printr-o acţiune de suprafaţă (tensioactivitate), permite şi o dispersiune omogenă (făcînd corpul bacilar hidrofil) ;

— o albumină serică (fracţiunea a V-a a lui Cohn de serumalbumină bovină), care neutralizează acţiunea toxică a fracţiunilor de acizi graşi eliberaţi prin hidroliza *tween*-ului.

În diagnosticul de rutină se folosesc mai ales mediul Loewenstein şi mediul Jensen.

Însămînţarea sputei pe aceste medii se face după o prealabilă omogenizare şi fluidificare şi eliminarea concomitentă a florei de asociaţie. Însămînţarea produsului omogenizat şi neutralizat se face repartizînd cîte VI-XII picături de fiecare tub, folosindu-se pentru fiecare produs cel puțin 8–10 tuburi cu mediu.

În cazurile pozitive, coloniile de bacili încep să apară, în general, după 10–14 zile.

Inocularea la cobai se bizuie pe extrema sensibilitate a acestui animal față de bacilul tuberculozei. Injectarea produsului se face pe cale subcutanată (1–2 ml). Dacă produsul a fost foarte bacilifer, se observă cum de la finele primei săptămîni regiunea injectată se împăstează, pentru ca începînd cu săptămîna a doua să devină fluctuentă, iar la nivelul plicii inghinale să se simtă la palpare un ganglion dur, mobil, rulînd sub degete. Nodulul evoluează, crește, se ramolește și abcedează sub forma unui ulcer fistulizat (șancrul de inoculare), care persistă pînă la moartea animalului. Reacția alergică se pozitivează. Animalul slăbește, grupele ganglionare se hipertrofiază, ca și splina și ficatul, care prezintă la autopsie tuberculi miliari și plaje cazeoase caracteristice. Dacă produsul a fost sărac în bacili, boala animalului poate avea o evoluție mai mult lungă (cam 6 luni), iar la autopsie leziunile sînt discrete, necesitînd adesea pentru diagnostic o reinoculare la un animal nou, de fragmente de organe prelevate după o tehnică specială.

Diagnosticul serologic al infecției bacilare este foarte relativ și de aceea nu are valoare practică. El constă în decelarea anticorpilor umorali specifici, care sînt însă doar „teste de infecțiozitate”, fără raporturi directe cu evoluția bolii. Punerea lor în evidență se poate face pe două căi, și anume:

— *reacții de fixare a complementului* și
— *reacții de hemaglutinare și hemoliză condiționată.*

Reacțiile de fixare folosesc ca antigeni fixatori, fie antigenul Besredka (cu ou), fie, mai bine, antigenul metilic. Rezultatele obținute sînt inconstante.

Reacțiile de hemaglutinare se bizuie pe proprietatea hematiilor, care au absorbit în prealabil un extract bacilar de natură polizaharidică, de a fi aglutinate în prezența serurilor provenite de la indivizi cu bacili tuberculoși (Middlebrook-Dubos). Extractul polizaharidic poate fi obținut, fie din mediile de cultură sintetice în care au crescut bacili tuberculoși, fie chiar din corpii bacilari omorîți prin căldură. Rezultatele obținute sînt mult mai constante și mai fidele decît acelea ale reacțiilor de fixare.

Diagnosticul de laborator al tuberculozelor extrapulmonare

Tuberculoza renală se traduce bacteriologic prin eliminare de bacili Koch prin *urină.* Prezența bacililor în urina pielică înseamnă totdeauna existența de leziuni bacilare în parenchimul renal. Dacă însă aceste leziuni sînt localizate în regiunea corticală a rinichiului și nu comunică cu căile de excreție, urinile nu conțin bacili; din momentul în care leziunea parenchimatoasă capătă acces într-un tub urinifer, baciluria devine pozitivă aproape în toate cazurile.

Examenul urinii pentru bacili Koch este relativ simplu. Prelevarea urinii diferă, după cum este recoltată de la bărbat sau femeie. La femeie, se face în prealabil toaleta organelor genitale externe, dezinfectînd cu permanganat de potasiu regiunea vulvară. Se reperează orificiul uretral și se introduce în vezică o sondă sterilă (metalică sau de cauciuc). Se recoltează 100—200 ml urină într-un recipient steril. Dacă urina este clară, se centrifughează într-un tub de centrifugă steril (eventual după adăugarea prealabilă a 1—5 ml alcool 50% pentru modificarea densității), timp de cel puțin o oră, la turație mare (1 000 t/min.). Se îndepărtează lichidul supernatant, iar din depozitul obținut se fac frotiuri care se colorează cu Gram (pentru germenii banali) și Ziehl-Neelsen (pentru bacili acidorezistenți). Dacă urina este purulentă (aspect tulbure=piurie), se lasă să sedimenteze cîteva ore, se îndepărtează supernatantul și se examinează preparațiile din sediment. Examenul direct din sediment poate da o primă indicație, aproximativă, dacă este vorba de tuberculoză renală sau de altă infecție a căilor urinare. Pentru siguranță, acesta trebuie mai totdeauna completat cu o însămînțare pe mediu și chiar cu o inoculare la cobai. Pentru însămînțare, dacă urina nu cuprinde germeni banali, se însămînțează ca atare (VI-XIII picături într-un tub cu mediu Loewenstein) 8—10 tuburi, sau cu o suspensie în ser fiziologic steril, din depozitul de centrifugare. Dacă urina este infectată, depozitul se tratează în prealabil cu acid sulfuric 15% timp de 15 minute, apoi se spală (în chiar tubul de centrifugă) de trei ori cu ser fiziologic steril și se resuspendă final în 4—5 ml ser fiziologic steril. Din această suspensie se însămînțează 6—8 tuburi cu mediu Loewenstein, cu cîte X-XII picături de fiecare tub. Inocularea la cobai se face injectînd subcutanat la doi cobai cîte 2 ml urină, tratată ca mai sus, dacă aceasta este clară și lipsită de germeni banali (sau cuprinde foarte puțini, dat fiind că pe această cale cobaiul tolerează injectarea unui produs ușor contaminat). Pentru urinile tulburi, se injectează aceeași cantitate din depozitul tratat în prealabil cu acid și suspendat în ser fiziologic, după indicațiile de mai sus. Tratarea depozitului în vederea inoculării sau însămînțării se mai poate face și cu hidrat de sodiu (sodă) 4%, agitare, incubare o oră la 37°, centrifugare 15 minute și neutralizarea depozitului final cu HCl 4%. Pentru examenul de urină, însămînțarea pe medii și inocularea la animal prezintă o deosebită importanță, întrucît în aparatul genito-urinar există numeroși bacili acidorezistenți saprofiți, imposibil de deosebit prin examenul direct de bacilii tuberculozei.

2. **Tuberculoza intestinală** rar primitivă, mai totdeauna secundară uneia pulmonare (ftizie), se traduce — în unele cazuri — prin eliminări de bacili pe cale ano-rectală (fecale). În marea majoritate a cazurilor însă, prezența bacililor în stomac sau în fecale ține tot de leziunile pulmonare (înghițirea sputelor bacilifere) și mult mai rar de leziunile apărute secundar pe cale hematogenă, pe intestin.

Căutarea bacililor Koch în fecale, în scop diagnostic, se folosește din ce în ce mai puțin în practică. Două metode sînt de recomandat:

a) *Metoda Ogawa*: se emulsionează într-un mojar aproximativ 1 g fecale cu 15 ml tripaflavină soluție 1%. Se filtrează prin tifon și se adaugă la filtrat o cantitate dublă de acid sulfuric 1%. Se lasă în contact o oră, apoi se centrifughează, se îndepărtează (decantează) lichidul supernatant și se cercetează (frotiu, însămînțare, inoculare) depozitul.

b) *Metoda Venot-Moreau*: se recoltează într-un vas steril materiile fecale emise spontan şi se amestecă bine cu o baghetă de sticlă. Se iau din amestec 50 g şi se pun într-un mojar (dacă sînt lichide se tratează cu sare : 20 g NaCl pentru 100 g fecale). Fecalele se triturează cu o baghetă, adăugînd puţin cîte puţin dintr-o soluţie de NaCl 25%, pînă cînd se capătă o suspensie semilichidă. Se trece prin tifon steril (pentru a se îndepărta resturile de celuloză etc.), apoi se pun în două tuburi de centrifugă (pînă la 2/3 din înălţimea acestora). Se echilibrează precis tuburile, după care se adaugă în fiecare tub cîte 2 ml dintr-un amestec în părţi egale de eter sulfuric şi ligroină. Se agită puternic tuburile (astupate ermetic) pentru a emulsiona ligroina, apoi se centrifughează 10 minute la 5 000 t/min. La partea inferioară a eterului se formează o zonă cenuşie (1—2 mm grosime), care conţine aproape totalitatea florei microbiene, inclusiv bacilii care s-ar găsi eventual în fecale. Se prelevă o mică parte din această zonă cu o ansă de platină recurbată sau spatulată şi se întinde pe lame curate, tratate în prealabil cu albuş de ou acetic (preparare : se agită puternic albuşul unui ou timp de cîteva minute cu un amestec de 150 ml apă distilată + 3 ml acid acetic; se filtrează; se obţine un lichid albuminos, care se conservă indefinit).

Din cauza prezenţei posibile de bacili acidorezistenţi saprofiţi în fecale, se impune o mare prudenţă în darea rezultatului (trebuie făcute culturi după metoda specială cu orto-oxichinoleină).

Căutarea bacililor Koch în spălăturile gastrice. Se face bolnavului un tubaj gastric, introducîndu-i în stomac, pe nemîncate, o sondă gastrică sterilă, prevăzută la capătul liber cu o pîlnie de sticlă. Ţinînd pîlnia la nivelul gurii bolnavului, i se introduce repede prin sondă conţinutul unui pahar cu apă călduţă (sau bicarbonatată 2%). Se lasă apoi în jos capătul cu pîlnie, pentru a realiza un sifon, şi se recomandă bolnavului să facă în acel moment un efort de vomitare. Lichidul care vine prin sondă este cules într-un pahar mare sau într-un lighean (oală) steril. Se extrage sonda şi se recomandă bolnavului să tuşească, spre a expulza şi eventualele mucozităţi împreună cu restul de spută. Lichidul de spălătură este transvazat într-un pahar Berzelius steril, acoperit cu o placă Petri şi lăsat să depună pînă a doua zi (pentru un rezultat mai rapid, se poate şi centrifuga). Se îndepărtează lichidul supernatant şi se face examenul bacteriologic complet al sedimentului (frotiu direct, omogenizare, flotaţie, însămînţare, inoculare) după procedeele indicate. Sonda gastrică poate fi introdusă şi după ce se dă în prealabil bolnavului să bea un pahar de apă călduţă bicarbonatată, pe care o va voma imediat după introducerea sondei în stomac. Dacă bolnavul nu poate înghiţi sonda din cauza reflexelor de vomă, se recomandă să i se anestezieze regiunea rino-faringiană cu o soluţie de cocaină 5%.

3. **Tuberculoza meningiană** necesită căutarea bacililor Koch în lichidul cefalorahidian. Examenul bacteriologic al lichidului trebuie făcut paralel cu cel citologic şi biochimic (numărarea elementelor, glicorahia, clorurorahia).

Se extrag aseptic, prin puncţie lombară sau suboccipitală, 10 ml lichid cefalorahidian în două tuburi sterile de centrifugă. Se centrifughează o jumătate de oră la turaţie mare (5 000 t/min.), se îndepărtează lichidul supernatant complet dintr-un tub, lăsînd 2—5 ml lichid limpede deasupra în celălalt. Din depozitul primului tub se fac 3 frotiuri (unul se va colora cu Gram, pentru flora banală, altul cu Giemsa, pentru citologie şi al treilea cu Ziehl-Neelsen pentru bacili acidorezistenţi). Depozitul celui de-al doilea tub, emulsionat în restul de lichid cefalorahidian, se însămînţează în 8—10 tuburi cu mediu Loewenstein (cîte X—XII picături de fiecare tub), 5—6 tuburi cu geloză înclinată 2% (pentru flora de asociaţie), iar restul de lichid se injectează subcutanat (cîte 1 ml) la doi cobai. Este recomandabil ca — dacă mijloacele o permit — centrifugarea lichidului cefalorahidian să fie făcută în tuburi speciale, tip Bretey (cilindrice, inoxidabile, cu fundul plat şi detaşabil). Se pune în prealabil pe fund o lamelă circulară, pe care se va depune depozitul de centrifugare (care, de regulă, în cazul lichidului cefalorahidian este foarte redus şi aderă greu). După centrifugare se poate proceda direct la colorarea lamelei. Dacă depozitul obţinut este prea redus, se pot face şi preparaţii „în picătură", punînd pe fiecare lamă 3—4 picături şi lăsîndu-le la termostat pînă se usucă; se fixează cu alcool-eter şi se colorează. Cînd nu se poate obţine nici un depozit, se precipită albuminele cu cîteva picături de acid sulfosalicilic 20% (sau sulfat de amoniu saturat 0,5 —1 ml), apoi se centrifughează. Dacă există o floră de asociaţie mai bogată, se tratează cu hidrat de sodiu, se neutralizează cu acid sulfuric în prezenţa tincturii de turnesol după procedeul cunoscut şi numai după aceea se însămînţează şi se inoculează la animal.

Cercetarea lichidului cefalorahidian este importantă în cursul tratamentului cu streptomicină şi HIN, în cursul căreia frecvenţa bacililor în lichid scade rapid; se impune deci a se practica cultura şi inocularea la animal pe prima probă de lichid cules. Pentru cultură, trebuie ca după centrifugare depozitul să fie reluat în puţin ser fiziologic, şi nu în lichid cefalorahidian (spre a se elimina cît mai mult posibil antibioticul).

4. **Tuberculoza seroaselor cu revărsări lichidiene** (lichid pleural, ascită, hidrocel etc.) se diagnostichează bacteriologic după o tehnică asemănătoare cu cea pentru lichidul cefalorahidian. Se prelevă aseptic, în tub steril de 10—15 ml, lichid; se notează aspectul în momentul culegerii şi în momentul sosirii la laborator (unele lichide sedimentează şi devin seropurulente, altele floculează sau coagulează).

Pentru depistarea bacililor tuberculoşi, dacă lichidul nu conţine germeni banali, se însămînţează direct cu pipeta Pasteur 6—8 tuburi Loewenstein (cîte X-XII picături la fiecare tub) şi se incubează la termostat în poziţie înclinată. Lichidele contaminate se centrifughează, iar sedimentul se tratează cu hidrat de sodiu 4% şi se neutralizează cu acid sulfuric, după procedeul cunoscut.

5. **Tuberculozele miliare în faza diseminării hematogene** se pot uneori depista bacteriologic prin două metode: hemocultura şi puncţia sternală.

Pentru *căutarea bacililor Koch în sînge* (metoda Tunaru) se recoltează aseptic, prin puncţie venoasă, 3 ml sînge într-un balonaş (Fourneau) de 150 ml, care conţine 18 ml acid sulfuric 1% în ser fiziologic. Se lasă o oră la termostat (38°), apoi se adaugă 2 ml dintr-o suspensie sterilă de carbonat de magneziu 3%. Se agită energic şi se lasă încă 10 minute la termostat, după care tot amestecul se însămînţează într-un balonaş cu mediu Sauton. Începînd cu ziua a şasea, bacilii devin vizibili în frotiurile prelevate din mediul Sauton sub forma unor filamente (zooglee), iar coloniile vizibile macroscopic apar din ziua a 20-a sub forma unor mici grunji albicioşi dispuşi la suprafaţa prafului cărămiziu de la fundul balonaşului; ei cresc luînd aspectul de „miez de pîine la fundul unui pahar cu ceai". Dacă nu apar colonii macroscopice, se pot face treceri pe mediul Loewenstein. Balonaşele trebuie uneori ţinute sub observaţie pînă la 3 luni mai înainte de a afirma un rezultat negativ (timpul mediu de observaţie fiind 6 săptămîni).

Căutarea bacililor Koch în măduva sternală se face numai în cazurile de tuberculoze miliare, în cele viscerale dînd rezultate constant negative. Se practică o puncţie sternală după tehnica specială, iar produsul de puncţie se pune într-o sticlă de ceasornic sterilă. Din cuprinsul lui se prelevă (cu acul seringii) porţiunile grăsoase de măduvă şi se fac două frotiuri: unul mai subţire care se colorează cu May-Grünwald-Giemsa, pentru citologia mielogramei, şi celălalt mai gros se colorează cu metoda Ziehl, pentru bacili acidorezistenţi. Restul produsului se însămînţează pe mediul Loewenstein şi eventual se inoculează la cobai.

6. **Tuberculoza genitală,** la femeie, se poate diagnostica bacteriologic prin căutarea bacililor la nivelul mucoasei uterine. În acest scop se practică o biopsie a endometrului prin raclarea mucoasei, iar produsul de raclaj este tratat cu hidrat de sodiu 4%, urmat de centrifugare şi însămînţarea depozitului pe mediul Loewenstein. Se poate folosi, în locul raclajului, sîngele menstrual prelevat cîteva zile la rînd cu seringa şi tratat în mod analog.

La bărbat, sperma — recoltată prin coit întrerupt, într-un prezervativ sterilizat prin fierbere — este tratată cu hidrat, centrifugată şi depozitul spălat cu ser fiziologic se însămînţează pe mediul Loewenstein-Jensen şi se inoculează eventual şi la cobai.

Tot în cadrul depistării bacililor tuberculoşi în produsele patologice, este util să amintim şi procedeele de punere în evidenţă a bacililor tuberculoşi în laptele provenit de la vaci suspecte de tuberculoză (mamită tuberculoasă), care ar putea infecta în special copiii mici. Redăm tehnicile care s-au dovedit mai eficiente în practica noastră:

1. Se iau 50 ml lapte şi se centrifughează o jumătate de oră (3 000 t/min), se îndepărtează supernatantul, iar depozitul obţinut se tratează cu un volum egal dintr-o soluţie N/10 de sodă şi cîteva picături de tinctură de turnesol. Se amestecă bine totul şi se lasă o jumătate de oră la termostat, apoi se neutralizează cu o soluţie N/10 de acid clorhidric. Se centrifughează din nou şi depozitul de centrifugare se cercetează în frotiu (coloraţia Ziehl) şi se însămînţează pe 10—15 tuburi cu mediul Loewenstein.

2. Se iau 100 ml lapte şi se centrifughează o jumătate de oră la 4200 t/min, se îndepărtează zerul şi crema. Se triturează depozitul obţinut în 8 ml dintr-un amestec — preparat extemporaneu — de 5 ml soluţie 1% de tripaflavină şi 3 ml antiformină 15%, lăsîndu-se în contact o jumătate de oră la temperatura camerei. Se centrifughează din nou timp de 25 de minute la 4 800 t/min. Se formează un mic depozit, iar supernatantul limpede este acoperit de o peliculă foarte fină, cuprinzînd numeroşi bacili (dacă sînt). Lichidul se evacuează prin aspiraţie (cu ajutorul unei pipete cu bulă), în aşa fel încît pelicula fină să se aplice pe fundul şi pe

pereţii tubului. Atunci se adaugă 6 ml soluţie de acid sulfuric 0,25%, se agită şi se lasă în contact o jumătate de oră. Se centrifughează iarăşi 20 de minute (4 300 t/min). Evacuarea lichidului se face respectînd noua peliculă superficială. Amestecul acesteia cu depozitul se însămînţează pe mediul Loewenstein.

3. Se pun cîte 20 ml din laptele de cercetat în două tuburi de centrifugă (de 50 ml sterile), se adaugă în fiecare tub alţi 20 ml dintr-o soluţie alcoolo-amoniacală (amestec din : 1 litru alcool de 80° şi 120 ml amoniac pur), agitînd uşor pînă se face un amestec omogen. Amestecul se lasă două ore la temperatura camerei, după care este centrifugat îndelung (o oră la turaţie mare, 5 000 t/min). Prin aceasta facem ca grăsimile să se adune la suprafaţa lichidului sub forma unui disc consistent, laptele devine opalescent (cazeina se solubilizează), iar densitatea lui scade. Bacilii tuberculozei se găsesc adunaţi în depozitul de centrifugare. Se decantează (cu o pipetă cu bulă neefilată), discul de grăsime şi lichidul supernatant, iar din depozit se fac frotiuri pe lame. Frotiurile nu sînt fixate la flacără, ci sînt lăsate să se usuce la termostat, în cutii Petri, apoi sînt fixate cu alcool-eter şi colorate cu Ziehl-Neelsen. Depozitul se emulsionează în 6 ml apă distilată sterilă, emulsia neutralizîndu-se cu acid clorhidric N/10 în prezenţa tincturii de turnesol şi se însămînţează apoi pe mediul Loewenstein (cîte 0,5 ml în fiecare tub); dacă este posibil, se inoculează şi doi cobai pe cale subcutanată, cu cîte 1—2 ml suspensie.

Determinarea sensibilităţii bacililor Koch la streptomicină

1. *Titrarea în mediul Sauton.* Bacilii tuberculozei obţinuţi prin însămînţarea produsului patologic pe un mediu cu ou (Loewenstein-Jensen) sînt reînsămînţaţi într-un balonaş cu mediu Sauton. După aproximativ 2 săptămîni se obţine la suprafaţa mediului un văl fin. Între timp, se pregătesc serii de flaconaşe (tip penicilină) în care se repartizează cîte 2 ml mediu Sauton de fiecare flaconaş, la care se adaugă sub volum constant (1 ml) cantităţi crescînde de streptomicină (între 10 şi 200 γ/ml). Un flaconaş cu mediu fără streptomicină este lăsat ca martor. Flaconaşele sînt apoi însămînţate cu fragmente de văl egale între ele (diametrul circa 3 mm), prelevate cu ansa circulară de platină cu ochiul de 3 mm diametru, din vălul fin obţinut în prealabil. Rezultatul se citeşte după 10—15 zile de incubaţie la 37°, notîndu-se concentraţia de antibiotic din ultimul flaconaş la care s-a mai produs o creştere a vălului în raport cu flaconaşul martor. Acesta reprezintă numărul de unităţi de streptomicină (γ/ml) la care germenul mai poate rezista.

2. *Titrarea în mediul Youmans* sau *Dubos.* Se folosesc serii de tuburi — foarte bine spălate — cuprinzînd cît 5 ml mediu de tub, la care se adaugă cantităţi crescînde, variind între 2,5 şi 50 γ/ml streptomicină. Bacilii prelevaţi pe mediul solid Jensen sînt trecuţi într-un balonaş sterilizat cu perle, în care sînt suspensionaţi cît mai fin cu putinţă în 2 ml mediu. Suspensia finală este diluată 1 :10 şi se însămînţează în doza de 0,1 ml de fiecare tub ; se agită şi se incubează la 37°. Citirea rezultatelor se face după 5—6 zile pentru tuburile cu mediu Dubos şi după 8—10 zile (cu un control nou după 2 săptămîni) pentru cele cu mediu Youmans. Primul tub în care se constată absenţa de tulburare sau de flocoane corespunde dozei limite inhibitoare a streptomicinei pentru

germenii cercetați (se va exclude prin control microscopic o suprainfectare a mediilor cu germeni banali). O cultură mai mult sau mai puțin abundentă, sau apărînd mai mult sau mai puțin tardiv, denotă o rezistență parțială.

Galland recomandă o serie compusă doar din 4 tuburi, un martor și 3 cu mediu, cuprinzînd respectiv: 2γ, 10γ și 50γ streptomicină/ml mediu, socotind că:

— dacă doza de 2 γ este inhibitoare, tulpina este sensibilă;

— dacă tulpina este rezistentă între 2 și 10 γ, este la limita rezistenței;

— dacă rezistența se manifestă între 10 și 50 γ, tulpina trebuie socotită rezistentă, iar dacă depășește 50 γ, este vorba de bacili foarte rezistenți la streptomicină.

3. *Titrarea in vivo pe cobai* (metoda Daddi) constă în injectarea în dermul unui cobai a 0,1 mg/0,1 ml dintr-o suspensie de bacili de cercetat. În alte două locuri diferite se injectează doze echivalente dintr-o tulpină de bacili sensibili și dintr-o tulpină de bacili rezistenți la streptomicină. Animalul primește apoi, timp de 3 săptămîni, cîte 10 mg streptomicină. Apoi se compară între ele șancrele de inoculare obținute, care vor fi cu atît mai pronunțate, cu cît tulpina este mai rezistentă, și invers.

4. *Titrarea directă pe medii solide*, cea mai curent întrebuințată astăzi, este aplicată direct produselor patologice bacilifere și prezintă avantaje clinice deosebite, întrucît:

— prezintă o apreciere a rezistenței bacililor din produsele patologice îndată după emiterea lor din organism;

— necesită un timp de răspuns bacteriologic relativ scurt.

Aceste avantaje compensează într-o largă măsură lipsa relativă de rigurozitate în ce privește proporțiile exacte ale rezistenței, care de altfel nu sînt esențiale pentru conducerea tratamentului. Tehnicile cele mai recomandabile sînt următoarele:

a) *Tehnica Bretey-Boisvert.* Se folosesc tuburi de preferință tip Legroux, cu mediul Jensen, în care se introduce streptomicină, așa încît să se realizeze o concentrație de $1\gamma/cm^2$ (exemplu: ținînd seama că un tub Legroux are o suprafață de circa 50 cm^2, vom introduce: 50γ pentru a avea o concentrație de 1γ cm^2 sau 250 γ pentru a avea o concentrație de 5 γ/cm^2 etc.). Antibioticul se introduce în tub la fundul acestuia, ținut în poziție înclinată și pe fața lui ventrală (opusă suprafeței mediului), adăugîndu-se totodată cîteva picături de turnesol. Concentrația de streptomicină pentru fiecare tub trebuie preparată sub volum de 0,25 ml (de exemplu, pentru tubul pentru care vrem să realizăm o concentrație de 10 γ/ml streptomicină, vom folosi o diluție de 2 000 γ/ml, care corespunde la 500 γ/0,25 ml și care repartizată pe 50 cm^2 va realiza 10 γ/cm^2). După introducerea antibioticului, tubul este întors în poziție normală, așa ca soluția de streptomicină să impregneze uniform întreaga suprafață a mediului (control după colorația uniformă dată de turnesol). Tuburile se capușonează și se pun la termostat la 37°, în poziție orizontală. După evaporarea excesului de lichid, cînd suprafața mediului a căpătat o colorație uniform albăstruie, tuburile sînt însămînțate.

Produsele patologice sterile (lichid cefalorahidian, lichid pleural, ascită etc.) sînt însămînțate ca atare, adăugînd în fiecare tub o aceeași cantitate de produs (de exemplu, XII picături sau 0,5 ml). Dacă este contaminat, se tratează în prealabil cu NaOH 4%, timp de o oră la termostat, se neutralizează cu H_2SO_4 4% în prezența tincturii de turnesol și apoi se însămînțează.

Rezultatul se citește după 3—6 săptămîni. Coloniile încep să apară de obicei după 15 zile, la început punctiform și strălucitor, ușor de distins pe fondul albastru al mediului, apoi bine dezvoltate, tubul martor începînd cu săptămîna a treia.

b) *Soluția de streptomicină poate fi adăugată la mediu, în timpul preparării lui.* În acest caz, antibioticul se adaugă la tubul cu mediu (10 ml de tub) imediat înaintea coagulării. Pentru prepararea *soluției de streptomicină* în vederea încorporării, se procedează astfel : la 1 g de pulbere (flaconul original) se adaugă 9,2 ml apă bidistilată sterilă și se dizolvă. Se obține astfel o concentrație echivalentă cu 100 000 γ/ml, din care se realizează apoi concentrațiile de 10 000 γ/ml, 1 000 γ/ml și 100 γ/ml. Din aceste soluții-mame, se încorporează înaintea coagulării cantitatea necesară la un volum dat de mediu, spre a căpăta concentrația finală dorită. Pentru streptomicină, se consideră „praguri de rezistență” concentrațiile de 2γ/ml și de 10γ/ml. Citirea rezultatului se face între a 15-a și a 20-a zi, sau, în caz de urgență, prin raclarea microcoloniilor de pe suprafața mediului, după 10—14 zile.

5. *Metoda Price-Bernard-Kreis* este bazată pe cultura directă pe lame a produselor patologice bacilifere. Lame înguste, cu frotiurile tratate după metoda indicată, sînt introduse în tuburi conținînd mediul Youmans, mediul Dubos fără *Tween 80* sau numai sînge, citratat diluat cu un volum egal de apă distilată, în care s-au adăugat cantități crescînde de streptomicină. Totul se incubează la termostat (37°). După 10—14 zile de incubare se examinează una din lamele martor (fără adaos de streptomicină) care se scoate din mediu cu o pensă, se usucă, se fixează la flacără. Se colorează cu Ziehl-Neelsen și se examinează cu obiectivul mic dacă s-au dezvoltat colonii de germeni acidorezistenți ; se procedează în mod analog și cu restul lamelor din tuburile cu mediu cu adaos de streptomicină, notîndu-se concentrația antibioticului din tubul în care dezvoltarea de colonii a fost oprită.

Metoda este comodă și rapidă, însă aplicarea ei rămîne limitată la produsele patologice foarte bacilifere și este legată de frecvența relativ mare a contaminărilor cu flora secundară.

Determinarea sensibilității bacililor Koch la hidrazida acidului izonicotinic (HIN). Metodele de determinare sînt foarte asemănătoare acelora folosite pentru streptomicină (vezi mai sus).

În practică, se recomandă să se procedeze astfel : se cîntăresc 100 mg hidrazidă care se pun într-un tub, în care se adaugă apoi II picături de apă distilată sterilă și 2 ml acetonă. Se notează pe tub nivelul lichidului și se încălzește tubul în baie cu apă la fierbere, pînă la dizolvarea substanței. Se completează volumul lichidului pînă la semn, se lasă să se mai răcească, apoi se repartizează cîte 0,2 ml în tuburi sterile, care se lasă la termostat pînă la evaporare. Tuburile, conținînd cîte 10 mg substanță uscată (cristalizată) se conservă timp nelimitat (la frigider), iar în momentul întrebuințării se adaugă, pentru un tub, 10 ml apă bidistilată (concentrația 1 000 γ/ml) și se filtrează prin Seitz EK.

Dacă folosim pentru titrare mediul solid cu ou al lui Jensen (cum se practică îndeobşte), se încorporează hidrazida în balonaşele cu mediu încă necoagulat, aşa ca la volumul total de mediu să avem o cantitate de hidrazidă corespunzînd la 0,2 γ/ml şi 1,0 γ/ml.

Metoda indirectă de titrare este, desigur, mai precisă, dar ea presupune obţinerea bacililor în cultură pură. Se impune însă, în cazurile de produse paucibacilare sau cele cu rezultat negativ la examenul direct.

O dată obţinută cultura, tehnica testării sensibilităţii constă în următoarele :

— se prelevă cu ansa de platină o cantitate cît mai mare de masă bacilară (colonii) de pe suprafaţa mediului, care se agită într-un balon cu perle sterile (timp de 1 minut), după care se adaugă puţină apă distilată sterilă (2—3 ml). Se trece suspensia obţinută într-o eprubetă sterilă, în care se mai adaugă din apa distilată pînă la obţinerea unei opacităţi corespunzătoare concentraţiei de 1 mg germeni/ml (comparaţie cu un tub-etalon conţinînd exact 1 mg corpi BCG/ml, dinainte preparat). Suspensia obţinută se diluează mai departe din zece în zece (10^{-1} mg/ml ...10^{-5} mg/ml), iar diluţiile finale sînt însămînţate pe mediile cu şi fără tuberculostatic, după următoarea schemă (folosită în Institutul de ftiziologie din Bucureşti) :

Diluţia	Martor	HIN		Streptomicină		PAS		Trecator	Cicloserină	Viomicină
		(γ/ml) 0,2	1	2	10	1	10	20	25	20
1:200	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1

O dată însămînţate, tuburile se pun la termostat, în poziţie înclinată (aproape de orizontal), timp de 72 de ore, după care se capuşonează ermetic şi se readuc la poziţia verticală. Rezultatele se citesc după 3—4 săptămîni, cînd se apreciază proporţia de bacili rezistenţi prin numărătoarea coloniilor apărute şi reportarea la „proporţia critică'' (Canetti) adoptată pentru tuberculostaticul respectiv, spre a aprecia dacă acesta se află de o parte (sensibilitate) sau de alta (rezistenţă) conform schemei redată în tabelul LVIII.

Se consideră, în general, ca *rezistente* tulpinile cu dezvoltare identică aceleia din tuburile martore ; *parţial rezistente*, cele care prezintă diferenţe cantitative faţă de tuburile martor şi *sensibile*, acelea care dau un număr foarte mic de colonii sau nu se dezvoltă de loc.

Determinarea sensibilităţii bacililor Koch la acidul paraaminosalicilic (PAS). Se recomandă folosirea sării sodice (PAS sodic). Metodele folosite sînt aceleaşi ca şi la streptomicină şi HIN, socotindu-se : sub 0,5 γ/ml, bacili sensibili ; între 0,5 şi 2,5 γ/ml, bacili la limita sensibilităţii ; între 2,5 şi 10 γ/ml, bacili clinic rezistenţi ; peste 10 γ/ml, foarte rezistenţi.

Profilaxia specifică a infecţiei tuberculoase

Vaccinarea antituberculoasă. Îndată după descoperirea bacilului tuberculozei, numeroşi cercetători au căutat ca — aplicînd procedeele pasteuriene de vaccinare (atenuarea bacteriilor sau a produselor lor) — să

Tabelul LVIII

Substanţa tuberculostatică	Concentraţia (γ/ml)	„Proporţia critică" (%)
Hidrazidă	0,1	10
	0,2	1
Streptomicină	2	50—100
	4	1
PAS	0,25	10
	0,50	1
Trecator	10	50—100
	20	10
Cicloserină	20	50—100
	30	10
Viomicină	20	50—100
	30	10

Sau, simplificînd, se poate nota :

+++ : creştere confluentă
++ : colonii izolate (∞) } rezistenţă
+ : colonii izolate (numărabile 20—100)

— : colonii < 20 } sensibilitate
= : lipsa coloniilor

obţină o protecţie activă împotriva tuberculozei. Aceste încercări se sprijineau pe semnificaţia atribuită fenomenului Koch în mecanismul imunităţii antituberculoase : intoleranţa organismului infectat faţă de reinfecţii.

S-au cercetat astfel numeroase procedee şi metode vizînd la obţinerea unui vaccin eficace (tuberculina şi alte extracte bacilare, bacili omorîţi sau atenuaţi prin diferite metode, bacili vii de tip aviar sau de la animale cu sînge rece, bacili vii umani sau bovini atenuaţi sau virulenţi). Cu excepţia acestora din urmă, toate procedeele încercate s-au arătat nesatisfăcătoare. Numeroase experienţe au arătat că numai bacilii vii, cu virulenţă redusă, pot conferi organismului o rezistenţă semnificativă faţă de infecţia virulentă.

Este meritul lui A. Calmette şi C. Guérin de a fi reuşit să obţină, prin artificii experimentale, o astfel de tulpină, cunoscută de atunci sub numele de *vaccinul B.C.G.* (bacili Calmette-Guérin).

Tulpina iniţială virulentă de la care s-a plecat a fost o tulpină bovină izolată din laptele unei vaci tuberculoase şi care a fost cultivată timp de 13 ani pe un mediu cu cartofi biliaţi glicerinaţi 5%. Pe măsură ce creştea numărul trecerilor în serie, se constata o scădere progresivă a virulenţei, aşa încît tulpina, care la început omora cobaiul în 60 de zile în doza de 0,0001 mg, după 4 ani ajunsese avirulentă pentru cobai şi bovidee. La 13 ani de la însămînţare, după 230 de treceri neîntrerupte pe cartof biliat, tulpina devenise total avirulentă. Caracterele biochimice nu au suferit modificări semnificative. Bacilii B.C.G. îşi păstrează aceleaşi proprietăţi morfologice şi tinctoriale ca şi germenii de origine. Ei posedă proprietăţi antigenice remarcabile, sînt buni producători de tuberculină şi conferă animalului o sensibilizare alergică intensă. Caracterele imunobiologice ale tulpinii B.C.G. prezintă o fixitate remarcabilă ; micile modificări de virulenţă reziduală sînt datorite condiţiilor diferite de întreţinere în culturi.

Inocuitatea B.C.G. la animal a fost dovedită experimental pe toate căile de administrare posibilă. Accidentele şi complicaţiile administrării vaccinului la om sînt practic neglijabile. Ele se reduc, la copilul mic, la reacţii ganglionare de vecinătate, care afectează ganglionii submaxilari şi cervicali după administrare bucală, a celor axilari după vaccinarea la braţ şi a celor inghinali după vaccinarea la nivelul coapsei. Ele apar la 4—10 luni după vaccinare, fără vreo modificare a stării generale a copilului.

Eficacitatea vaccinului în ce priveşte puterea lui protectoare faţă de infecţia virulentă, a fost dovedită în mod indiscutabil, atît la animalele de laborator, cît şi la om. O protecţie remarcabilă se obţine şi la bovidee ceea ce arată valoarea vaccinului B.C.G. în profilaxia tuberculozei bovine Rezultatele cele mai preţioase au fost obţinute în vaccinarea preventivă (premuniţia) a copilului mic. La acesta, tuberculoza este totdeauna mult mai gravă, iar posibilităţile de contaminare directă sînt foarte mari.

Primele încercări de vaccinare au fost făcute în 1921, în sînul familiilor cu copii născuţi din mame tuberculoase cu leziuni deschise şi a căror îmbolnăvire ulterioară părea inevitabilă. În ţara noastră, vaccinul B.C.G. a fost introdus de profesorul Cantacuzino în anul 1926.

Astăzi, în ţara noastră, vaccinul B.C.G. se prepară şi se livrează sub două forme : *lichidă* şi *liofilizată*.

Vaccinul B.C.G. lichid se livrează în fiole a 1 ml şi 2 ml pentru aplicare percutanată şi în flaconaşe a 3 ml pentru administrare perorală.

Valabilitatea lui este, la întuneric şi la rece, de 14 zile de la data preparării.

Vaccinul B.C.G. liofilizat, suspendat în prealabil într-un amestec stabilizator (10% zaharoză cu 1% gelatină), este repartizat în fiole speciale (a 6 ml) în cantitate de 0,6—1,0 ml (3—5 doze), care prin solvare în momentul întrebuinţării (în 3—5 ml ser fiziologic) revine la concentraţia utilă de 40 mg/ml. După liofilizare, termenul de valabilitate este de 6 luni de la data preparării.

Căile de administrare a vaccinului :

1. *Calea orală*, cea dintîi încercată, date fiind simplitatea administrării la copilul mic, absenţa complicaţiilor şi faptul că în primele săptămîni de la naştere mucoasa intestinală este permeabilă pentru germeni. La început se administrează, în primele 3 zile după naştere, 3 doze a cîte 0,01 g vaccin la interval de 2 zile, şi apoi se revaccinează la 1, 3, 5, 7 şi 15 ani, pentru ca mai tîrziu revaccinarea să fie făcută numai la cei tuberculinonegativi. În general, reacţiile alergice pozitive obţinute prin această metodă sînt relativ reduse (cam 30%), ceea ce a făcut pe unii să considere administrarea bucală puţin eficace. Totuşi, statisticile au arătat că metoda determină o scădere notabilă a mortalităţii prin tuberculoză la vaccinaţi, în raport cu cei nevaccinaţi. Recent, De Assis (Brazilia) a arătat că administrarea bucală a vaccinului B.C.G. este foarte eficientă dacă vaccinul este administrat printr-o singură doză masivă, chiar dacă vaccinarea se face concomitent cu expunerea copiilor la infecţie (,,vaccinare concurentă iterativă''). Majoritatea autorilor afirmă că ,,metoda braziliană'' duce la o desensibilizare tuberculinică netă, concomitent cu o rezistenţă mărită (evoluţie favorabilă a bolii).

2. *Calea subcutanată* este puţin folosită, din cauza reacţiilor locale adesea supărătoare pe care le provoacă (noduli ramoliţi şi chiar formare de abcese reci).

3. *Calea intradermică* este preţioasă prin precizia ei, permiţînd o dozare exactă a cantităţii de vaccin injectat. Aceasta se injectează strict în derm, cu o seringă de tuberculină în doza de 0,1 ml dintr-o suspensie care conţine 0,25—0,50 mg/ml, în 1—2 injecţii. Reacţia vaccinală locală se traduce prin apariţia unui mic nodul care se resoarbe după cîteva săptămîni, şi numai rareori ajunge la abces. Procentul de pozitivări ale reacţiei la tuberculină atinge cifra de peste 95%, iar gradul de

rezistență cîștigată față de infecție, apreciat pe criterii statistice, este foarte semnificativ.

4. *Calea transcutanată* este calea de elecție pentru vaccinare, întrucît prezintă o eficiență maximă, fără inconvenientele reacțiilor locale. Efectuarea ei constă în înțeparea dermului cu ajutorul unor ace și aplicarea la nivelul înțepăturilor a suspensiei vaccinale, care pătrunde astfel în derm. Operația se practică cu ajutorul unui vaccinostil special, care produce automat 20—30 de înțepături. Vaccinul se aplică pe fața anterioară a coapsei sau în regiunea deltoidiană a brațului, curățite și dezinfectate în prealabil. Fiola cu suspensie vaccinală se agită energic pentru omogenizare și se depune pe piele (5—6 picături), în așa fel încît să fie cuprinsă în aria platoului cu ace, după care se aplică aparatul. Prin declanșarea acestuia, acele străbat prin stratul de vaccin în derm, provocînd apariția unei mici cantități de serozitate sanguinolentă. Vaccinul este lăsat apoi cîteva minute, spre a fi absorbit la nivelul înțepăturilor. Metoda este nedureroasă, nu provoacă supurații superficiale și nici adenopatii. Reacțiile vaccinale apar în medie după 7—15 zile, sub forma unor mici noduli congestivi, uneori pustuloși, rareori ca mici abcese sau escare, cu tendință la regresiune și cicatrizare după cîteva săptămîni sau luni. Dacă individul vaccinat a fost alergic, reacțiile vaccinale sînt mai precoce și iau aspectul unui fenomen Koch, fără a determina tulburări ale stării generale sau reacții de focar. Ele apar mai ales la indivizii cu alergie infratuberculinică, la care reacțiile la tuberculină au fost negative, deși organismul era sensibilizat. Pentru punerea în evidență a acestor alergii s-a mai recomandat practicarea așa-numitului B.C.G.-test (Ustvedt), care constă în injectarea intradermică a 0,1 mg suspensie B.C.G. (sau practicarea unei înțepături printr-o picătură de vaccin) omorît prin căldură. În caz de reacție pozitivă apare la locul injecției, după 3—5 zile, o reacție ulceronecrotică care traduce existența unei sensibilizări alergice a organismului.

În ultimul timp a fost încercată și metoda prin scarificări cutanate, care constă în depunerea pe pielea brațului a 3—4 picături vaccin B.C.G (5 mg/ml); prin grosimea picăturilor se practică cîteva scarificări superficiale. După cîteva minute, se acoperă regiunea cu celofan. Reacția apare după 20—30 de zile sub forma unor foliculi dispuși de-a lungul scarificărilor, care adesea confluează; alergia se instalează într-o proporție de 100% din cazuri dacă vaccinul a fost proaspăt.

În general, *alergia postvaccinală*, tradusă prin pozitivarea reacției la tuberculină, apare de obicei la 1—3 luni după vaccinare, uneori chiar după 6 luni. Această pozitivare, cunoscută sub numele de *viraj tuberculinic*, este de regulă mai slabă decît cea dată de o infecție virulentă și poate fi depistată cel mai bine prin testul Mantoux, folosind concentrații descrescînde de tuberculină (1 : 1 000 000—1 : 100). Reacțiile foarte intense la diluții foarte mari indică aproape sigur un focar tuberculos activ.

Intensitatea alergiei conferite prin vaccinare depinde în largă măsură de calea de administrare a vaccinului (alergiile cele mai intense se obțin prin vaccinarea intradermică, cele mai slabe pe calea orală). Pe lîngă doza de vaccin, gradul de alergizare mai depinde și de viabilitatea bacililor din vaccin, absorbția cantitativă a acestuia, reactivitatea individuală etc.

Vaccinarea se practică obligatoriu la toți nou-născuții. Se mai vaccinează și toți copiii de vîrstă preșcolară și școlară, ca și adulții tineri, găsiți tuberculinonegativi (anergici). Se amînă de la vaccinare nou-născuții prematuri, distroficii, cei cu icterul nou-născuților sau suferind de alte boli intercurente, pînă la completa lor restabilire; vaccinarea cu B.C.G. nu se va face concomitent cu alte vaccinări, ci la distanță de cel puțin o lună de acestea.

Rezistența conferită de vaccinul B.C.G., deși indiscutabilă, este relativă și trecătoare; ea durează atîta vreme cît în organism mai persistă corpi microbieni de B.C.G. în stare vie, care creează acestuia așa-numita „premuniție". Studiile statistice au arătat că grație premuniției, morbiditatea și în special mortalitatea prin tuberculoză în lume au suferit, o dată cu aplicarea B.C.G. pe scară largă, o reducere considerabilă.

Frecvența și gravitatea infecțiilor tuberculoase primare au fost considerabil influențate, după cum a fost influențat în bine și prognosticul îndepărtat al primoinfecțiilor în ce privește șansele de apariție a ftiziilor la vîrsta adultă.

Chimioprofilaxia este metoda cea mai recentă pentru profilaxia tuberculozei, folosind proprietățile protectoare ale hidrazidei acidului izonicotinic (HIN). Chimioprofilaxia prin hidrazidă se adresează cu precădere indivizilor (în special copii mici) aparent sănătoși, dar expuși contaminării, purtătorilor de „leziuni primare minime", precum și celor cu viraj tuberculinic care sînt sterilizați precoce de focarul recent ocult, împiedicîndu-se astfel diseminarea infecției. Metoda ar putea duce la o și mai mare scădere a morbidității prin tuberculoză.

Micobacteriile saprofite

Alături de micobacteriile patogene, în natură se găsesc extrem de răspîndiți numeroși germeni, care prezintă caractere comune cu acestea (acidorezistență, caractere morfologice, tinctoriale și de cultură etc.) dar în condiții naturale sînt lipsite de virulență și patogenitate pentru animale și om. Ei sînt întîlniți în sol, ape, ierburi, grăsimi, gunoaie animale și vegetale, lapte, secreții animale etc. Spre deosebire de micobacteriile adevărate, acești germeni cresc pe medii de cultură uzuale (geloză simplă), după o perioadă de timp mult mai scurtă (24—72 de ore) și la temperatura camerei; foarte adesea coloniile se pigmentează intens (colonii cromogene). Creșterea este favorizată de prezența glicerinei și, spre deosebire de acidorezistenții adevărați, nu sînt inhibați de prezența PAS în mediu.

Puterea patogenă experimentală, la animal, este practic inexistentă. Inoculați pe cale subcutanată, se poate obține, în unele cazuri, o leziune locală discretă, fără tendință de evoluție. Pe cale intravenoasă, cu o doză suficient de mare, se poate provoca apariția de mici tuberculi în viscere, care, de obicei, se vindecă spontan. Calea intraperitoneală este mai severă, mai ales dacă se inoculează doze mari; în acest mod se pot obține, pe suprafața organelor principale din cavitatea abdominală (ficat, splină) și pe epiploon, numeroase false membrane. Inocularea în adjuvanți (ulei de parafină, unt topit) face ca leziunile să devină mai pronunțate, mergînd uneori pînă la moartea animalului. Rolul bacililor paratuberculoși în patologia umană este foarte redus.

Micobacteriile atipice

În produse patologice provenite de la bolnavi cu sindroame etichetate clinic drept tuberculoză, au fost puse în evidență micobacterii cu caractere particulare care le situează, se pare, între micobacteriile patogene adevărate și cele saprofite. Proprietățile specifice lor sînt: creșterea rapidă, pigmentogeneza intensă (de unde și denumirea de „cromogeni”, sub care mai sînt cunoscuți), caractere biochimice speciale și patogenitate redusă pentru animal. Pînă în prezent, s-au separat în cuprinsul lor 4 grupe deosebite, după intensitatea pigmentogenezei în prezența luminii, și anume:

— *Fotocromogenii* (tip *M. Kansasii*), care formează colonii de culoare galben-portocalie chiar după o expunere de cîteva secunde la lumină. Prezintă o creștere mai rapidă decît a bacililor tuberculoși tipici, dar mai lentă decît a celor saprofiți.

— *Scotocromogenii* se pigmentează la întuneric, căpătînd o colorație galbenă. Sînt lipsiți de putere patogenă.

— *Nefotocromogenii* (*M. Battey*) prezintă caractere amintind bacilii aviari. Sînt foarte heterogeni, majoritatea dînd colonii nepigmentate sau cu o slabă pigmentație roz-gălbuie, neinfluențată de lumină. Au, de asemenea, o creștere mai rapidă decît a acidorezistenților tipici, și mai lentă decît a saprofiților.

— *Bacilii cu „creștere rapidă”*, denumiți astfel din cauza rapidității cu care se dezvoltă în culturi, ajung la maximum de dezvoltare după numai 3—5 zile de la însămînțare, chiar la temperatura camerei.

Mycobacterium leprae și lepra

Aparține, ca și *M. tuberculosis*, familiei *Mycobacteriaceae*.

Sînt micobacterii patogene, care se deosebesc de grupul *Mycobacterium tuberculosis* și *M. paratuberculosis*, prin *parazitismul* lor strict, ele nefiind cultivabile pe nici unul dintre mediile de cultură cunoscute pînă în prezent. Cuprind două genuri bine distincte, după gazdele pe care le parazitează, și la care provoacă infecția cunoscută sub numele de lepră: *Mycobacterium leprae* (Hansen, 1868), agentul patogen al leprei umane și *Mycobacterium leprae murium* (Stefansky, 1903), agentul patogen al leprei șobolanilor, cunoscut și sub numele de bacilul lui Stefansky.

Istoric. Lepra, care a constituit odinioară unul dintre marile flagele ale omenirii, a fost recunoscută pentru prima oară în scrierile lui Aristot (345 î.e.n.).

Habitat. Bacilul leprei este, într-o măsură și mai mare decît cel al tuberculozei, un parazit obligatoriu. Contagiunea este strict interumană, omul fiind singura gazdă cunoscută. Contaminarea se face plecînd de la secrețiile nazale bacilifere ale bolnavilor și, într-o mai mică măsură, de la bacilii din leziunile cutanate deschise (leproame).

Caractere morfologice și tinctoriale. Bacilul leprei este acido-alcoolorezistent, prezentîndu-se sub forma unui bastonaș (bacil), lung de 1—7 μ și gros de 0,2—1,4 μ; gram-pozitiv, imobil, colorabil prin mai toți coloranţii uzuali, dacă acţiunea lor se prelungeşte mult în timp. Coloraţi după metoda Ziehl-Neelsen, apar roşii intens, adeseori cu granulaţii care depăşesc diametrul celulei bacteriene. Bacilii pe cale de degenerescenţă, apar granuloşi, membrana tinde să dispară, iar granulaţiile se dezagregă. Corpii bacilari sînt în general dispuşi unii lîngă alţii, în pachete (ca ţigările în pachet), ocupînd în special citoplasma mononuclearelor, sub formă de „globii''. *Globiile* sînt învelite într-o substanţă gelatinoasă şi transparentă (zoogleea leproasă); împreună cu mononuclearele pe care le parazitează, acestea constituie celulele leproase caracteristice bolii.

Caractere de cultură. Bacilul leprei nu a putut fi cultivat, pînă astăzi, pe nici unul dintre mediile de cultură cunoscute. Metabolismul şi echipamentul lui enzimatic nu-i permit o adaptare la mediile artificiale de cultură; singurul mediu care pare a fi permis o cultivare de scurtă durată este acela a lui Suwo-Kui (amestec de plasmă de găină cu suc embrionar de pui, în care se însămînţează histiocite, fibroblaşti şi celule epiteliale infectate cu bacilii leprei).

Structura antigenică a bacilului leprei este foarte puţin cunoscută, din pricina imposibilităţii cultivării lui. Între tulpinile „Carville'' cercetate de Bagder (1940) par să existe aglutinogene specifice deosebite, şi un aglutinogen comun. Ele au putut servi şi ca antigene pentru reacţii de fixare cu seruri de leproşi. Bacilul leprei pare să posede un antigen comun cu bacilul tuberculozei, întrucît serurile leproşilor aglutinează intens hematiile sensibilizate cu polizaharidul tuberculos (C. Ionescu-Mihăieşti şi C.C. Oprescu).

Caractere de patogenitate ale agentului cauzal. Bacilul leprei nu este patogen, în mod practic, pentru nici unul dintre animalele de laborator. Prin inocularea de suspensii de leproame la diverse animale (cobai, iepuri şi mai ales maimuţe) se obţin leziuni locale specifice, cu caracter abortiv, neurmate de vreo generalizare a infecţiei şi care numai rareori pot fi transmise în serie. Singurul animal la care pare să se fi obţinut, recent, o generalizare a leziunilor, este hamsterul. La om, inocularea accidentală poate fi urmată de conferirea bolii.

Infecţia la om este considerată, astăzi, ca o reticuloendotelioză infecţioasă, cu leziuni afectînd mezenchimul. Acestea constau din leproame formate din noduli (tuberculi), în a căror structură intră celulele leproase (mononuclearele parazitate de bacili Hansen), dispuse în jurul capilarelor sanguine şi în spaţiile limfatice ale ţesutului conjunctiv. Ele evoluează fără supuraţie sau cazeificare, dar se pot ulcera şi infecta secundar. Leproamele cele mai frecvente sînt localizate în derm, pe care îl îngroaşă considerabil, ceea ce face ca de pildă faţa bolnavului să capete un aspect caracteristic: faciesul leonin. În formele cu predominanţa leproamelor intradermice — lepra lepromatoasă sau tuberculoidă, se observă căderea părului (alopecie), invadarea mucoaselor (pituitară) şi a globilor oculari (cecitate). Invadarea nervilor (axonilor şi tecilor de mielină), cu alterarea lor prin compresiune, duce la forma nervoasă a leprei, care provoacă apariţia de paralizii motorii, tulburări de sensibilitate şi leziuni trofice cu mutilaţii. Cele mai frecvente sînt formele mixte, care debutează cu macule cutanate şi tulburări de sensibilitate periferică. La indivizii cu rezistenţă scăzută, boala capătă un caracter malign, cu generalizare în viscere, urmată de moarte.

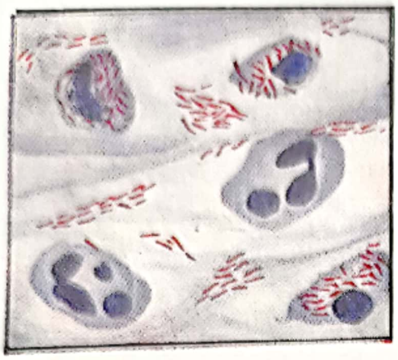


Fig. 124. — Frotiu din mucus nazal — celule leproase cu „globi” (colorație Ziehl-Neelsen)

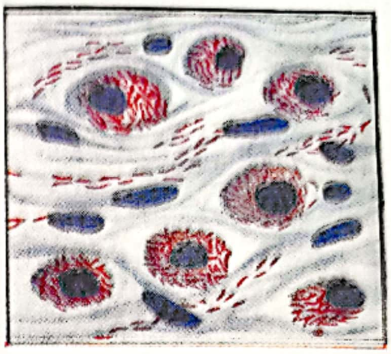


Fig. 125. — Secțiune printr-un leprom.

Fig. 126. — *Bordetella pertussis* — pe mediul Bordet-Gengou, cultură de 48 de ore (×10).

Imunitatea congenitală sau prin infecție este manifestă în formele lente, în care multă vreme sînt afectați numai ganglionii inghinali. Starea de sensibilizare specifică (alergia) poate fi testată prin reacția Mitsuda: se injectează intradermic o suspensie de leprom, în care bacilii au fost omorîți prin căldură; în cazurile pozitive, la locul de infecție apare, după 24 de ore, o puternică reacție infiltrabilă caracteristică, care durează cîteva săptămîni.

Tratamentul leprei, se reducea — pînă recent — la administrarea uleiului de Chaulmoogra și a albastrului de metilen 1% intravenos, cu rezultate mediocre și inconstante. Recent, au fost încercate cu succes sulfonele: diaminodifenilsulfona, „sulfona-mamă”, promina, promacetina etc. și dihidrostreptomicina.

Diagnosticul de laborator

Se face prin cercetarea prezenței bacilului leprei în mucusul nazal și în leproamele cutanate. Examenul mucusului se face, fie prin raclarea energică a mucoasei septului nazal și etalarea produsului de raclaj pe o lamă, care se va colora prin metoda Ziehl-Neelsen, fie provocînd o coriză medicamentoasă cu iodură de potasiu, și culegerea secreției obținute pe un tifon steril, care este apoi întinsă pe lamă și colorată în același mod. Rezultatul pozitiv este dat de prezența „globiilor” în mononucleare (celule leproase).

Examenul leproamelor permite un diagnostic mai precoce. Se prelevă, prin biopsie, un fragment de la periferia unei macule sau a unui leprom, care se triturează mărunt în mojar, și se etalează pe lame care sînt colorate după metoda Ziehl-Neelsen. La nevoie se poate practica și examenul anatomopatologic al fragmentului prelevat; în cazurile pozitive, se constată o masivă infiltrație limfocitară, perivasculară sau în jurul glandelor sebacee, și numeroase „celule leproase”. În formele nervoase se găsesc formațiuni nodulare de tip granulomatos, înconjurate de colagen și cuprinzînd numeroase limfocite, celule leproase, epitelioide și plasmodii plurinucleate, fără reacție hiperplazică ori infiltrație cu polinucleare. Leziunile au oarecare analogie cu cele de tuberculoză cutanată, fără prezența de tuberculi și cazeificări, de unde și denumirea de „tuberculoide”, care li s-a dat.

Epidemiologie

Lepra este o boală transmisibilă, a cărei propagare pare condiționată de factori de mediu speciali: mizerie și climat cald și umed.

În zilele noastre, receptivitatea omului din regiunile temperate și cu standard de viață mai ridicat este extrem de redusă. Copiii par mai receptivi decît adulții. Boala este mai frecventă la bărbați decît la femei. În Europa, valul epidemic care cuprindea Norvegia în cursul ultimului mileniu este aproape stins (numai 3 cazuri între 1925 și 1931). În unele țări afro-asiatice, ea este încă endemică și numărul de cazuri relativ ridicat.

★

Mycobacterium lepraemurium (bacilul Stefansky). A fost descoperit în 1903, de Stefansky, la Odesa, la șobolanii sălbatici capturați în acel oraş. Este un germen cu aceleaşi proprietăţi morfologice şi tinctoriale, ca şi bacilul Hansen. Este un bacil acido-alcoolo-rezistent, avînd 1,5—4 μ lungime, drept sau incurbat, cu dispoziţie în „globii" în citoplasma mononuclearelor. Nu este cultivabil pe nici unul din mediile de cultură cunoscute.

Boala poate fi transmisă în serie, la animalele sensibile : şobolanul negru sau alb, pe toate căile de administrare, şi mai ales prin injectarea intraperitoneală a unui fragment de leprom. În acest mod se obţine dezvoltarea de leproame pe epiploon şi mezenter, animalul se caşectizează şi moare. Cobaiul, iepurele şi maimuţa sînt refractare.

Contaminarea naturală se face între şobolani prin muşcături. Boala este relativ frecventă (0,5% cazuri forme ganglionare, 0,6% forme cutanate).

Genul Haemophilus şi infecţiile corespunzătoare

Dr. Viorica Andreescu

Genul *Haemophilus* cuprinde o serie de specii bacteriene care au caractere morfologice şi unele proprietăţi biologice comune, diferenţiindu-se prin caractere de parazitism, patogenitate, structură antigenică etc.

Germenii aparţinînd genului *Haemophilus* se prezintă sub forma de cocobacili, uneori cu aspect pleomorf, imobili, gram-negativi, aerobi, nesporulaţi, strict paraziţi, dezvoltîndu-se numai în prezenţa unor substanţe accesorii.

Clasificare. Genul *Haemophilus* aparţine familiei *Brucellaceae*. Unele specii bacteriene, incluse în genul *Haemophilus* au afinitate pentru arborele respirator sau conjunctivă : *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *H. aegiptius* etc., iar altele pentru mucoasa genitală : *H. ducreyi*, *H. haemoglobinophilus* etc.

Majoritatea speciilor, aparţinînd genului *Haemophilus* afectează animale cu sînge cald ; s-a descris o specie : *H. piscium*, care afectează animale cu sînge rece.

Haemophilus influenzae

Haemophilus influenzae, izolat de Pfeiffer în 1892, în cursul marii pandemii de gripă care a bîntuit Europa între anii 1890 şi 1893, constituie specia cea mai reprezentativă a genului *Haemophilus*.

Istoric. Prezenţa *H. influenzae* în secreţiile nazofaringiene ale bolnavilor de gripă a îndreptăţit pe primii cercetători să considere cocobacilul, izolat de Pfeiffer, cauza acestei afecţiuni.

Cercetări ulterioare efectuate, punînd în evidenţă prezenţa germenului, nu numai în secreţiile nazo-faringiene ale bolnavilor de gripă, ci şi în secreţiile nazo-faringiene ale unor indivizi suferind de alte afecţiuni respiratorii, precum şi la indivizi normali, atît în timpul epidemiilor de gripă, cît şi în perioadele interepidemice au infirmat rolul infecţios primar al *H. influenzae* în gripă.

În prezent, stabilindu-se definitiv etiologia virotică a infecției gripale, ca urmare a izolării virusului gripal, se atribuie *H. influenzae* un rol de „germen asociat sinergic'', infecției virotice, avînd rol patogen deosebit în cursul evoluției gripei și a complicațiilor sale.

H. influenzae, în afară de acest rol infecțios secundar în gripă și alte afecțiuni respiratorii, poate avea un rol infecțios primar în unele infecții piogene, frecvente la copii și extrem de rare la adulți.

Slavyk (1899) a izolat *H. influenzae* din lichidul cefalorahidian al unui copil bolnav de meningită; Rivers (1922) a descris importanța acestui germen în infecțiile meningiene. Taylor (1927) a arătat rolul *H. influenzae* în etiologia unor artrite purulente, iar mai tîrziu, Lemierre (1936) a descris sindromul obstructiv laringian, în infecțiile cu *H. influenzae* ale arborelui respirator superior, la copii mici.

În numeroase cercetări întreprinse asupra *H. influenzae* (Davis, 1917; Rivers și Poole, 1921; Fildes, 1921; Jordan, 1927; Scott, 1929 etc.) s-au determinat particularitățile sale morfologice și metabolice, standardizîndu-se metodele de diagnostic în funcție de cerințele sale nutritive.

Habitat. *H. influenzae* se izolează numai de la om; se localizează, în mod obișnuit, pe mucoasa arborelui respirator sau, mai rar, pe unele seroase: meninge sau seroase articulare.

Caractere morfologice. Aspectul morfologic al *H. influenzae* este în funcție de proveniența tulpinii.

În culturi, morfologia germenilor variază cu vîrsta: după 2—4 ore de incubare, majoritatea germenilor au forma de bacili iar după 6—8 ore, de cocobacili sau bacili scurți. Culturile de 24 de ore conțin cocobacili, slab colorabili și numeroase resturi celulare.

În produse patologice: lichid cefalorahidian, lichid pleural, lichid sinovial, spută etc. predomină formele cocobacilare; uneori se găsesc germeni cu aspect morfologic pleomorf; pe lîngă formele cocobacilare se pot vedea bacili, de dimensiuni variabile și forme filamentoase. Pleomorfismul este în genere, caracteristic tulpinilor în curs de a deveni *rough* și tulpinilor izolate din procese patologice pe cale de vindecare. *H. influenzae* se prezintă, în mod obișnuit, sub forma unui cocobacil de dimensiuni reduse: 0,2—0,3 μ/0,5—1,5 μ dispus în lanțuri scurte sau grămezi. *H. influenzae* este gram-negativ, imobil, nesporulat în culturi tinere și în exsudatele leziunilor evolutive prezintă capsulă. Formele cocobacilare, colorate cu albastru Löffler 5 minute, sau cu soluție apoasă de fucsină 10%, timp de 5—10 minute, schițează o colorare bipolară.

Caractere de cultură. *H. influenzae* se cultivă în medii care conțin, în mod obligatoriu, factorii X și V, adică în medii cu sînge sau extracte globulare.

În medii lichide, tulpinile capsulate de *H. influenzae* prezintă o cultură omogenă, tulpinile necapsulate determină o creștere granulară, cu formare de sediment.

Dezvoltarea în medii lichide este mai abundentă, în condiții de aerare a mediului, fie prin agitarea continuă a mediului, fie prin folosirea unui strat subțire de mediu.

Geloza-sînge nu este un mediu satisfăcător pentru cultivarea *H. influenzae*; se preferă mediile în care componentele globulelor roșii sînt eliberate în mediu, în urma distrugerii hematiilor, prin acțiunea căldurii sau a digestiei peptice; geloza *chocolat*, mediul Levinthal și mediul Fildes.

Mediile Levinthal și Fildes prezintă avantajul de a fi transparente, față de geloza *chocolat*, care este un mediu cu aspect opac.

Dezvoltarea *H. influenzae* este în funcție de specia animală de la care provine sîngele, adăugat în mediul de cultură; sîngele de iepure, de om și de cobai favorizează creșterea, în timp ce sîngele de oaie și de capră are efecte inhibitoare.

Pe geloza *chocolat*, coloniile de *H. influenzae* sînt mici (după 18—22 de ore au un diametru de 0,5—0,8 mm), incolore, transparente, asemănătoare picăturilor de rouă sau de umezeală.

Pe mediile Levinthal și Fildes, coloniile sînt mari (după 18—24 ore, ating diametrul de 1—1,5 mm), rotunde, cu suprafața convexă sau conică, transparentă. În culturile tinere (6—12 ore), coloniile prezintă în lumina oblic transmisă, o strălucire specială care dispare după 24 ore; paralel cu acest fenomen, dispare capsula și începe autoliza bacteriană. Aceste trei modificări ce apar în cursul creșterii bacteriene: dispariția strălucirii speciale a coloniilor, pierderea capsulei și autoliza bacteriană, par a fi datorite eliberării unor enzime de către bacterii, în cursul multiplicării lor. Producerea acestor enzime, în cazul unei populații bacteriene reduse, necesită o perioadă mai lungă de timp. Coloniile dezvoltate pe geloza Levinthal, în urma unui inoculum slab, păstrează, după 18 ore, strălucirea caracteristică iar germenii își mențin capsula și nu prezintă semne de dezintegrare.

Caractere biochimice și de metabolism. *H. influenzae* se dezvoltă, în condiții optime, în aerobioză, la temperatura de 37° și la $pH = 7{,}6$; fiind dotat cu un echipament enzimatic redus ca și ceilalți germeni din genul *Haemophilus*, se dezvoltă numai pe medii care conțin sînge sau extracte de globule roșii.

Lipsa de dezvoltare a germenilor hemofili pe geloză-ser a dovedit că anumiți constituenți ai globulului sînt indispensabili cultivării acestor germeni. Davis (1917) a arătat că dezvoltarea *H. influenzae* este favorizată de o substanță, derivată din hemoglobină, care se găsește în țesuturi vegetale și animale și care poate fi sintetizată de unele specii bacteriene; ulterior această substanță a fost identificată cu factorul „V".

Fildes (1921) a constatat că un alt constituent globular — hemina — este absolut indispensabil cultivării *H. influenzae*. Fildes atribuia proprietatea stimulantă a heminei activității sale peroxidazice; s-a dovedit însă, mai tîrziu, că acțiunea stimulantă a heminei este datorită funcțiilor sale catalitice; fierul anorganic din compoziția sa, are capacitatea de a îndeplini funcții catalitice. Hemina a fost identificată ca factorul „X".

Numeroase cercetări, efectuate în scopul cunoașterii exigențelor nutritive ale germenilor din genul *Haemophilus*, au demonstrat necesitatea a doi factori, prezenți în sîngele total sau în extractele de globule roșii: factorul „X" și factorul „V".

Factorul „X": termostabil, este un fero-pigment sanguin — hemina; ia parte la sinteza unor enzime, care conțin fier și care au un rol activ în respirația aerobă a bacteriilor: citocromul, citocromoxidaza, catalaza și peroxidaza (Lwoff și Lwoff, 1937).

Factorul „V" : termolabil, se distruge în 15 minute la 120°, se găsește în țesuturi vegetale și animale, în levuri și bacterii. Din punct de vedere al compoziției chimice, a fost identificat cu codehidrogenaza 1 sau 2, di- sau trifosfopiridinnucleotidul (Lwoff și Lwoff, 1937).

Pittman (1935) consideră factorul „V" legat de procesele celulare de oxidoreducere.

S-a observat că *H. influenzae* crește mai abundent și dezvoltă colonii mai mari în imediata vecinătate a coloniilor de stafilococ sau a altor microorganisme; acest fenomen de satelitism, caracteristic pentru *H. influenzae*, descris de Grassberger (1897) și confirmat, ulterior, de alți cercetători, este datorit creșterii aportului de factor „V", sintetizat de stafilococi sau de alte microorganisme cu o capacitate de sinteză mai mare decît a *H. influenzae*. Factorul „V" sintetizat de bacterii, difuzînd în mediu, favorizează dezvoltarea germenilor care necesită acest factor și nu-l pot sintetiza.

H. influenzae fermentează slab glucoza, fără producere de gaz; în mod obișnuit, nu fermentează lactoza, manitolul. S-a constatat că cea mai mare parte din reacțiile fermentative ale *H. influenzae* se produc în mod neregulat, încît nu pot constitui un criteriu de identificare sau clasificare.

Kristensen (1922) a explicat diversitatea opiniilor asupra proprietăților fermentative ale *H. influenzae* prin capacitatea acestui germen de a produce acid din proteine. Unele tulpini, capsulate sau necapsulate, produc indol.

Proprietățile biochimice prezente, în mod constant, la toate tulpinile de *H. influenzae* sînt: reducerea nitraților în nitriți și biloliza. *H. influenzae*, prin proprietatea sa de a se liza în bilă sau săruri biliare (Sellard și Sturn, 1919, Pittman, 1931) se apropie de grupul pneumococilor.

Rezistența la agenți fizici, chimici și biologici. *H. influenzae* este distrus de căldură în 30 de minute la 55°; în genere, este sensibil la acțiunea antisepticelor obișnuite.

Culturile de *H. influenzae* se mențin, cu greutate, pe geloză *chocolat* sau suspendate în sînge defibrinat de iepure, la temperatura de + 4°. Conservarea tulpinilor de *H. influenzae*, în condiții optime, se realizează prin liofilizare.

H. influenzae este sensibil la sulfadiazină și sulfatiazol; aureomicina, cloramfenicolul, teramicina și polimixinele sînt mai eficiente asupra *H. influenzae* decît streptomicina și penicilina; dintre acestea, cloramfenicolul este cel mai activ (Alexander, 1949; Finland și Wileva, 1950; Tunneval, 1951).

Structura antigenică. Tulpinile de H. *influenzae*, izolate din arborele respirator, prezintă o largă heterogenitate antigenică; cele izolate din meningite sau alte afecțiuni, în care *H. influenzae* are un rol infecțios primar, se prezintă mai omogene din punct de vedere al structurii antigenice.

Pittman împarte tulpinile „S", capsulate, în 6 tipuri serologice, notate cu literele mici: a, b, c, d, e și f; tipul b fiind cel mai răspîndit, majoritatea infecțiilor sînt cauzate de acest tip.

Specificitatea de tip este determinată, ca și la pneumococ, de o substanță de natură polizaharidică, concentrată în capsula bacteriană.

Diferențierea tipurilor serologice se face prin reacții de umflare a capsulei, reacții de precipitare și reacții de aglutinare în prezența serurilor specifice de tip; polizaharidul specific de tip este răspunzător de toate aceste reacții, precum și de stimularea anticorpilor protectori.

H. influenzae, în cursul trecerii sale de la forma „S" la forma „R", pierde o dată cu capsula bacteriană și polizaharidul specific; totuși, această pierdere, în unele cazuri, pare a fi parțială, deoarece Mac Pherson (1948) a constatat prezența polizaharidului b, în extractele fenolice ale unei tulpini R, provenită din forma S, a unei tulpini de tip b.

S-au semnalat asemănări antigenice între polizaharizii capsulari ai unor tulpini de *H. influenzae* și polizaharizii pneumococici, s-a demonstrat, prin reacții încrucișate de umflare a capsulei și prin reacții de precipitare, că polizaharizii specifici ai tulpinilor a, b și c sînt înrudiți, din punct de vedere antigenic, cu polizaharizii specifici ai unor tulpini de pneumococ (Chapman și Osborne, 1942; Alexander 1946).

Antigenele somatice ale *H. influenzae* sînt mai puțin cunoscute, Platt (1939) a izolat din tulpini necapsulate două substanțe de natură proteică: *substanța „P"* netoxică, cu o specificitate de tip, punîndu-se în evidență prin distrugerea corpului microbian, și *substanța „M"*, toxică pentru animalele de laborator, comună tuturor tipurilor; substanța M pare a fi un antigen de suprafață, care se eliberează prin spălarea suspensiei bacteriene cu ser fiziologic.

Caractere de patogenitate. *H. influenzae* prezintă, în genere, o virulență slabă pentru animalele de laborator. S-a obținut multiplicarea bacteriană, urmată de invazie sanguină numai prin administrarea, la șoareci, pe cale intraperitoneală (Fothergill, 1937) sau pe cale intracerebrală de germeni suspensionați în mucină (Torregrossa și Francis, 1941).

Unele tulpini de *H. influenzae*, administrate în doză mare la animale de laborator, produc efecte letale toxice care ar fi cauzate de acțiunea unei endotoxine.

Dubos a obținut dintr-o tulpină „R" de *H. influenzae*, derivată din tipul „b", un antigen cu acțiune letală pentru iepure și cu proprietăți imunizante.

Patogenitatea *H. influenzae* pentru om este strîns legată de prezența capsulei și de elaborarea polizaharidului specific. Tulpinile capsulate au o putere patogenă mai mare decît cele necapsulate; se presupune că substanța polizaharidică specifică exercită asupra leucocitelor o acțiune asemănătoare celei exercitată de polizaharizii pneumococici.

Wright și Ward (1932) au descris un test de diferențiere a tulpinilor patogene de cele nepatogene, în funcție de rezistența lor în sîngele de iepure. Tulpinile patogene, suspensionate în sînge de iepure, supraviețuiesc, pe cînd cele nepatogene mor în scurt timp.

Variabilitate. *H. influenzae*, cultivat pe mediu solid, transparent Levinthal sau Fildes, după 18 ore de incubare, determină 2 feluri de colonii: colonii mari cu o strălucire caracteristică, în lumina oblic transmisă și colonii mici, albăstrui, lipsite de strălucirea specifică (Pittman, 1932). Culturile, obținute din coloniile mici, prezintă proprietăți diferite de cele ale culturii de origine: coloniile sînt lipsite de strălucirea caracteristică iar germenii au pierdut capsula.

Modificările morfologice sînt însoțite de importante modificări chimice care se traduc prin scăderea capacității antigenice. Titrul serurilor animalelor, inoculate cu tulpini modificate morfologic, este mai scăzut decît al serurilor provenite de la animalele inoculate cu germeni care n-au suferit influența enzimelor autolitice.

Aceste variante apar pe medii artificiale chiar în condiții optime de cultivare; în condiții mai puțin favorabile, cultura trece în faza ,,rough''.

H. influenzae prezintă o serie de variațiuni legate de proveniența tulpinii: tulpinile, izolate din procese patologice evolutive, dezvoltă colonii cu strălucire caracteristică, germenii sînt capsulați și tipabili cu serurile anti-*H. influenzae*, specifice de tip, în timp ce tulpinile, izolate din căile respiratorii superioare ale indivizilor sănătoși, sînt lipsite de aceste caractere.

Alexander și Leidy (1951) au reușit să confere specificitate de tip unor tulpini de *H. influenzae*, netipabile, lipsite de capsulă și de substanța polizaharidică specifică, prin menținerea în contact cu acid dezoxiribonucleic, extras din tipurile ,,a'', ,,b'' și ,,e''. Concomitent, au obținut schimbarea tipului serologic cu ajutorul acidului dezoxiribonucleic al unui tip heterolog, demonstrînd că absența specificității de tip nu este indispensabilă modificărilor genetice.

Ulterior (1953), punînd în contact *H. influenzae*, tip ,,b'' cu acid dezoxiribonucleic tip ,,a'', au obținut o populație microbiană care conținea în aceeași celulă bacteriană, atît antigenul ,,a'' cît și antigenul ,,b''. Acidul dezoxiribonucleic extras din aceste celule și pus în contact cu celulele ,,rough'', derivate din tipul ,,d'' a dat naștere unei populații microbiene, alcătuită din tipul ,,a'', tipul ,,b'' și celule conținînd ambele antigene ,,a'' și ,,b''. Alexander și Leidy (1954) au dovedit că într-o populație microbiană slabă, proporția celulelor sensibile la diverși agenți determinanți ai eredității este aceeași; astfel, într-o populație expusă acțiunii unui amestec de doi aminoacizi: 75% proveniți din *H. influenzae*, tip ,,b'' și 25% din *H. influenzae* tip ,,c'' s-a obținut aceeași proporție de celule transformate: 75%, celule tip ,,b'' și 25% celule tip ,,c''. Alexander și Leidy au transformat tulpini sensibile la streptomicină în tulpini rezistente la acest antibiotic, cu ajutorul acidului dezoxiribonucleic extras din tulpini streptomicino-rezistente.

Cercetînd, în continuare, inducerea rezistenței la streptomicină la diverse specii din genul *Haemophilus*: *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *H. suis* și *H. aegyptius* au dovedit că înrudirile dintre germenii receptori și donatorul de acid dezoxiribonucleic transformator, se reflectă în numărul celulelor transformate de un acid dezoxiribonucleic heterolog. Inducerea rezistenței la streptomicină, la *H. aegyptius*, s-a realizat, în procente asemănătoare, cu acid dezoxiribonucleic provenit atît de la *H. influenzae* cît și de la *H. aegyptius*, demonstrîndu-se strînsa înrudire între receptor și donator.

În general, frecvența transformărilor este cu atît mai mică cu cît acidul dezoxiribonucleic, transformator, provine de la o specie mai îndepărtată genetic.

Boala la om. *H. influenzae*, asociat cu diverse specii bacteriene (pneumococ, streptococ, micrococ cataral etc.), se găsește în majoritatea infecțiilor căilor respiratorii: inflamații catarale nazo-faringiene, traheite, bronșite, pneumonii, bronhopneumonii, precum și în otite și sinuzite; asociat cu virusul gripal în cursul pandemiilor de gripă, are un rol patogen important, acționînd ca agent secundar de invazie și de potențare a virusului.

H. influenzae, în afară de acest rol patogen secundar, poate avea un rol patogen primar în producerea unor infecții piogene, frecvente la copii și extrem de rare la adulți : meningită, sindrom obstructiv al căilor respiratorii superioare, pioartroză, pneumonie, emfizem, endocardită subacută, septicemie.

Meningita survine, în genere, după infecții ale sinusurilor, urechii medii sau ale celulelor mastoidiene; dacă nu este tratată, prezintă o mortalitate de 98%.

Sindromul obstructiv laringian, laringo-traheal sau laringo-traheobronhial se instalează consecutiv unei infecții respiratorii cu *H. influenzae*; se produce un edem marcat al mucoasei respiratorii, încît moartea poate surveni în primele 24 de ore.

Meningita și sindromul obstructiv laringian apar la copii mici — 2 luni pînă la 3 ani — și sînt cauzate numai de tipul „b”.

Infecția experimentală. *H. influenzae*, inoculat intraperitoneal la animale mici de laborator : șoareci, cobai și iepuri, determină moartea prin toxemie acută, fără invazia organismului; culturile omorîte și filtratele bacteriene produc același efect.

Wollstein (1911), inoculînd intrarahidian la maimuțe *H. influenzae*, a obținut un sindrom meningian.

Blake și Cecil (1920) au provocat la maimuțe, prin infectarea căilor respiratorii superioare, cu tulpini virulente pentru șoarece, leziuni similare celor întîlnite la om : pneumonii, bronhopneumonii etc.

Imunitate. Fothergill și Wright (1933), cercetînd starea de imunitate a populației față de *H. influenzae*, au constatat că sîngele total, defibrinat, al celor mai mulți adulți, are putere bactericidă pentru tulpinile virulente de *H. influenzae*; sîngele nou-născuților prezintă, de asemenea, proprietăți bactericide care dispar la 6 luni după naștere, ca să reapară treptat, începînd de la vîrsta de 3 ani.

Prezența anticorpilor în sîngele nou-născuților se datorează transmiterii transplacentare, iar reapariția lor, în jurul vîrstei de 3 ani, sugerează dobîndirea treptată a imunității active, în urma infecțiilor subclinice. Rezultatele cercetărilor lui Fothergill și Wright au demonstrat strînsa legătură dintre efectul bactericid al sîngelui indivizilor de diverse vîrste și susceptibilitatea sau rezistența acestora la infecțiile cu *H. influenzae*.

S-a încercat conferirea unei imunități active prin administrarea unui vaccin anti-*H. influenzae*, preparat din culturi tinere, de 6 ore, în vederea folosirii unui agent imunizant care să reflecte constituția chimică a germenilor existenți în infecția umană și s-a acordat o deosebită atenție formelor capsulate.

Ward și Fothergill (1932) și Fothergill (1937) au preparat, pe cal, un ser terapeutic anti-*H. influenzae*, specific față de tipul „b” care a fost administrat, dar fără succes, la 220 de cazuri de meningită cerebro-spinală, cauzate de *H. influenzae*.

Alexander (1939), folosind metodele de preparare a serurilor antipneumococice, a preparat un ser anti-*H. influenzae*, pe iepure, care a scăzut considerabil mortalitatea în cazurile de meningită cu *H. influenzae*; prin administrarea acestui ser, s-au obținut 80% vindecări clinice. S-a demonstrat că elementul protector, în serul anti-*H. influenzae*, preparat pe iepure, este anticarbohidratul.

Tratament. Infecțiile cu *H. influenzae* se tratează prin administrarea următorilor agenți antibacterieni: ser specific anti-*H. influenzae* preparat pe iepure, sulfamide, streptomicină, aureomicină, teramicină și cloramfenicol.

Selectarea agenților terapeutici este în funcție de durata și severitatea infecției.

În infecțiile căilor respiratorii superioare se pot obține vindecări, numai prin administrare de sulfamide.

În infecțiile mai severe: meningite, sindroame obstructive ale căilor respiratorii, pioartroze, pneumonii etc. se recomandă, totdeauna, asocierea a doi agenți terapeutici, în vederea evitării insuficienței unui singur agent terapeutic.

Cele mai bune rezultate terapeutice în infecții grave cu *H. influenzae* se obțin, în prezent, prin administrarea combinată a cloramfenicolului cu sulfadiazină.

În cursul infecțiilor cu *H. influenzae* se determină eficacitatea tratamentului, prin decelarea anticorpilor specifici în diverse lichide biologice: ser sanguin, lichid cefalorahidian, spută etc., cu ajutorul fenomenului de umflare a capsulei unor tulpini de *H. influenzae* cunoscute, precum și cu ajutorul intradermoreacției cu polizaharid specific.

Digle și Seidman (1941) au introdus acest test, de decelare a excesului de anticorpi circulanți, prin inocularea intradermică a 0,1 ml polizaharid specific, extras din tulpinile de *H. influenzae*, tip „b"; în cazul unui exces de anticorpi circulanți apare, în 30 de minute, o reacție pozitivă reprezentată prin eritem, la locul inoculării.

Diagosticul de laborator

Diagnosticul de laborator al infecțiilor cu *H. influenzae* constă în punerea în evidență a germenului sau a produselor sale, în diverse lichide biologice.

1. *prin procedee directe*:
   a) frotiuri;
   b) fenomenul de umflare a capsulei;
   c) reacția de precipitare;
2. *prin însămînțări pe medii speciale.*

— Lichidele biologice în care se cercetează prezența *H. influenzae* sînt lichidul cefalorahidian, sîngele și exsudatele urechii medii, exsudatele articulare, lichidele din empieme și mucusul nazo-faringian.

— Mucusul nazo-faringian se colectează cu ajutorul unui tampon de vată care se introduce, prin nări, pînă la peretele faringian posterior, unde se menține cîteva secunde; tamponul se introduce apoi în 0,2 ml bulion.

1. **Punerea în evidență** a *H. influenzae*, direct, în lichidele biologice:
a) *Frotiuri* care se colorează, după metoda Gram; în cazurile în care se găsesc cocobacili gram-negativi, cu o morfologie caracteristică

H. influenzae sau un amestec de cocobacili cu forme pleomorfe, se încearcă, imediat, identificarea germenilor prin punerea în evidenţă a fenomenului de umflare a capsulei sau prin reacţia de precipitare cu seruri anti-*H. influenzae*, specifice de tip.

b) *Fenomenul de umflare a capsulei* constă în punerea în contact, pe o lamelă, a 3 picături ser anti-*H. influenzae*, specific de tip, cu o cantitate egală de lichid biologic, de cercetat; amestecul se colorează, slab, cu o picătură de albastru de metilen, se răstoarnă lamela cu amestecul ser + lichid biologic, pe suprafaţa unei lame obişnuite, şi se examinează la microscop, de preferat, cu obiectivul cu imersie. Concomitent se face un martor: lichid biologic + ser fiziologic.

Apariţia fenomenului de umflare a capsulei bacteriene indică o reacţie pozitivă.

c) *Reacţia de precipitare* constă în punerea în contact, într-un tub de precipitare, a lichidului biologic de cercetat (o coloană de 1 cm), cu o cantitate egală de ser anti-*H. influenzae*, specific de tip.

Testul de precipitare pozitiv se manifestă prin apariţia unui inel alb de precipitare, la limita dintre cele două lichide. Reacţia se bazează pe eliberarea polizaharidului bacterian, specific, în lichidele biologice; rapiditatea formării precipitatului este în funcţie de concentraţia polizaharidului. Prin testul de precipitare se poate pune diagnosticul şi în cazurile în care germenii, fiind în număr redus, nu pot fi puşi în evidenţă prin examenul microscopic.

2. **Insămînţările** pe mediile speciale se fac în scopul izolării agentului patogen, ori de cîte ori nu se poate pune diagnosticul prin procedeele de identificare directă şi rapidă, în lichidele biologice.

Însămînţările lichidelor biologice de cercetat se fac pe mediile: Lewinthal, Fildes sau geloză-*chocolat*.

Bulionul Lewinthal, modificat de Pittman, se prepară adăugînd la o parte „Lewinthal"-stock, trei părţi bulion peptonat. „Lewinthal-stock" se prepară în felul următor: se fierbe bulionul — preparat, de preferinţă cu infuzie de inimă şi creier — Difco — cu sînge defibrinat de cal 10%; se filtrează amestecul bulion-sînge, mai întîi prin hîrtie Wattman nr. 12 şi apoi prin filtrul Seitz.

Geloza Lewinthal se prepară amestecînd în mod steril, cantităţi egale de „Lewinthal-stock" steril, cu geloză topită (1 litru apă + 45 g proteoză-agar nr. 3 Difco + 15 g agar).

Mediul Fildes (1920) se prepară prin adăugarea de sînge care a fost supus, în prealabil, unei digestii peptice, la geloză topită sau bulion.

Geloza *chocolat* se obţine prin adăugarea, la geloză topită (fierbinte), a unei cantităţi de 5—10% sînge defibrinat de iepure şi menţinerea amestecului la temperatura de 90°, timp de 5 minute; apoi tuburile se înclină sau se repartizează în cutii Petri.

3. **Identificarea** tulpinilor izolate se face prin cercetarea caracterelor morfologice, ale caracterelor de cultură — se urmăreşte apariţia de colonii cu aspect strălucitor caracteristic, în lumina oblic transmisă — prin punerea în evidenţă a fenomenului de umflare a capsulei bacteriene, prin reacţii de precipitare şi prin reacţii de aglutinare. Reacţiile de aglutinare prezintă acelaşi grad de specificitate ca şi reacţiile de precipitare, cu condiţia ca incubarea să se facă, timp de 2 ore, la 37°.

Dacă metodele de diagnostic expuse mai sus nu dau rezultate concludente, se procedează la identificarea tulpinii izolate, în funcţie de posibilităţile sale de dezvoltare în prezenţa factorilor „X” şi „V”.

Mediul care conţine factorul „X” se prepară amestecînd cantităţi egale de „Lewinthal-stock”, autoclavat 15 minute la 120°, pentru distrugerea factorului „V”, cu geloză topită.

Mediul care conţine factorul „V” se obţine prin adăugarea unei părţi de extract de drojdie la nouă părţi de geloză topită. Extractul de drojdie se prepară astfel : se emulsionează 100 g drojdie de bere pulbere, în 400 ml apă distilată : se ajustează pH = 4,6 ; se fierbe 10 minute ; se filtrează prin hîrtie de filtru, se ajustează pH = 7,0, apoi se sterilizează filtrîndu-se prin Seitz.

Mediul care conţine factorii „X” şi „V” se obţine prin adăugarea unei părţi de extract de drojdie la nouă părţi de mediu care conţine factor „X”.

Mediile, după preparare, se distribuie, în tuburi, cîte 3 ml.

Culturile de testat, se cultivă, în prealabil, pe geloză Lewinthal ; înainte de însămînţare se suspendă cultura în 0,2 ml ser fiziologic.

Speciile bacteriene cuprinse în genul *Haemophilus*, nefiind dependente în mod egal de prezenţa în mediile de cultură a celor doi factori de creştere („X” şi „V”), se pot diferenţia în funcţie de necesităţile lor nutritive, prin cultivarea în mediile care conţin numai factorul „X”, numai factorul „V” sau ambii factori (tabelul LIX).

Tabelul LIX

Particularităţile metabolice ale speciilor din genul *Haemophilus* în funcţie de factorii „X” şi „V”

Specii de *Haemophilus*	Factor „X” prezent	Factor „V” prezent	Factorii „X” şi „V” prezenţi	Factorii „X” şi „V” absenţi
1. *H. influenzae*	0	0	+	0
2. *H. aegyptius*	0	0	+	0
3. *H. suis*	0	0	+	0
4. *H. haemolyticus*	0	0	+	0
5. *H. gallinarum*	0	0	+	0
6. *H. parainfluenzae*	0	+	+	0
7. *H. parahaemolyticus*	0	+	+	0
8. *H. aphrophilus*	+	0	+	0
9. *H. influenzae murium*	+	0	+	0
10. *H. ovis*	+	0	+	0
11. *H. ducrey*	+	0	+	0
12. *H. haemoglobinophilus*	+	0	+	0

Epidemiologie

Infecţiile cu *H. influenzae* apar numai la om, acest germen fiind parazit al căilor respiratorii superioare ale omului. Tulpini necapsulate se pot izola din secreţiile nazo-faringiene ale indivizilor normali. S-a demonstrat că, în diverse infecţii ale aparatului respirator, virotice sau bacteriene, aceste tulpini dobîndesc capsula şi puterea patogenă.

Copiii (pînă la vîrsta de 3 ani) prezintă o sensibilitate deosebită faţă de *H. influenzae*, în special faţă de tipul „b”, care se izolează din majoritatea infecţiilor grave : meningite, sindrom obstructiv laringian etc.

Cercetări limitate au demonstrat prezența tipului ,,b'' la 80% din copiii purtători de *H. influenzae*.

Johnson și Fousek (1943) au constatat că 50% din adulții tineri (studenți la medicină) erau purtători de *H. influenzae* netipabili, în căile respiratorii superioare.

În cursul epidemiilor de gripă, anterior preparării vaccinului antigripal, se administra, în scop profilactic, un tetravaccin, în care se asociau următoarele antigene microbiene : *H. influenzae*, pneumococ, streptococ și micrococ cataral ; prin administrarea acestui tetravaccin se obținea o scădere a numărului complicațiilor și a gravității lor.

Haemophilus ducreyi

H. ducreyi a fost pus în evidență în secreția șancrului moale de Petersen (1887) și descris apoi de Ducrey (1889). Besançon, Griffon și Le Sourd (1890) au izolat germenul în cultură pură.

Habitat. *H. ducreyi* este parazit obligatoriu al omului, fiind agentul patogen al șancrului moale.

Caractere morfologice. *H. ducreyi* este un cocobacil de dimensiuni reduse : 0,5/1,5—2 μ. Pe frotiurile din secrețiile șancroase apare, de obicei, dispus în lanțuri scurte de 10—15 elemente (streptobacil) sau izolat, intra- și extracelular ; *H. ducreyi* este nesporulat, imobil, gram-negativ ; colorat cu albastru de metilen prezintă o ușoară colorare bipolară.

Caractere de cultură și de metabolism. *H. ducreyi* este un germen aerob ; temperatura optimă de dezvoltare este cuprinsă între 35 și 37° ; se cultivă greu pe medii de cultură. Istamonov și Akoitianț au obținut primele culturi de *H. ducreyi* pe un mediu îmbogățit cu extract de piele. Studiindu-se cerințele sale nutritive, s-a constatat că are nevoie de factorul X (Lwoff, 1939) și o tensiune scăzută de oxigen.

Se recomandă pentru izolarea și cultivarea *H. ducreyi* următorul mediu : geloză 3% + sînge defibrinat de iepure 20—30% ; după incubare 24 de ore, la temperatura de 35—37°, în atmosferă de CO_2 10%, se dezvoltă colonii mici, convexe, cenușii, strălucitoare, înconjurate de o mică zonă de hemoliză ; după 2—3 zile, coloniile se măresc și capătă în centru o depresiune crateriformă.

H. ducreyi crește abundent pe cheag de sînge de iepure, de oaie sau de om ; cheagul de sînge se obține prin încălzirea sîngelui, timp de 15 minute, la temperatura de 55° (Teague și Deibert, 1920).

În mediile lichide : bulion + sînge defibrinat de iepure 20% sau apă peptonată + sînge defibrinat de om 20% (mediul Nicolau și Banciu) *H. ducreyi* se dezvoltă, la suprafața mediului, sub forma unei pelicule.

Greenblatt (1938) a cultivat, cu succes, acest germene în sînge total defibrinat de iepure.

Rezistența la agenți fizici și chimici. *H. ducreyi* se distruge prin acțiunea căldurii (moare în 60 de minute la 55°), a uscăciunii și a antisepticelor obișnuite ; prezintă o sensibilitate moderată la sulfonamide, este sensibil la streptomicină și aureomicină.

Culturile de *H. ducreyi* se mențin viabile 30 de zile la temperatura camerei sau la incubator, în mediul următor : geloză 0,25%, amidon 1%

și sînge defibrinat de iepure 20%. Metoda cea mai bună de conservare a tulpinilor de *H. ducreyi* este liofilizarea; tulpinile liofilizate își păstrează proprietățile de virulență și patogenitate timp de 18 luni, la temperatura camerei.

Structura antigenică. *H. ducreyi* posedă un antigen care are proprietatea de a sensibiliza țesuturile indivizilor infectați. Vaccinurile, preparate din culturi omorîte de *H. ducreyi*, administrate intradermic, determină, la locul inoculării, o zonă de eritem care se menține 4–5 zile.

Această hipersensibilitate este persistentă, însă nu se instalează decît la aproximativ 30% din foștii bolnavi (Heyman).

S-a constatat că toate tulpinile de *H. ducreyi* sînt identice, din punct de vedere antigenic.

Boala la om. *H. ducreyi* este agentul etiologic al șancrului moale.

Leziunea apare după o incubație de 1–3 zile, de obicei pe mucoasa genitală și mai rar pe piele, sub forma unei eroziuni sau a unei mici pustule, care se transformă într-un ulcer necrotic cu baza moale, margini neregulate, ușor ridicate, cu suprafața acoperită de secreție purulentă. Este șancrul moale. La același bolnav pot apărea leziuni multiple. Șancrul moale se deosebește total de cel sifilitic, care este o leziune unică cu baza tare, margini regulate, suprafața curată, roz, lucioasă, și prezintă adenopatia caracteristică. Șancrul moale este însoțit, deseori – însă nu în mod obligatoriu – de inflamația ganglionilor regionali care se pot transforma în adevărate abcese.

Infecția experimentală. *H. ducreyi* este, în genere, nepatogen pentru animalele de laborator.

Ducrey a reprodus leziunea caracteristică prin reinocularea secreției șancroase pe antebrațul aceluiași bolnav.

Nicolle, inoculînd la maimuțe, în pleoapă sau prepuț, culturi de *H. ducreyi* sau secreții din leziuni umane, a obținut leziuni tipice.

Feiner și Mortara au determinat apariția de leziuni șancroase, asemănătoare celor umane, prin inocularea intradermică la iepuri albi de Noua Zeelandă a culturilor de *H. ducreyi*; animalele infectate prezentau o sensibilitate cutanată față de culturile omorîte de *H. ducreyi*, timp de 3 luni.

Imunitate. Infecția cu *H. ducreyi* nu lasă imunitate după vindecare; reinfectările sînt posibile.

Organismul indivizilor infectați prezintă, după cum s-a arătat, o sensibilitate specifică față de antigenul microbian.

Tratament. Tratamentul actual al șancrului moale constă în administrarea *per os* de sulfonamide, cloramfenicol sau tetracicline.

În unele cazuri, mai rezistente la tratamentul cu sulfamide și antibiotice, se asociază unele metode mai vechi de tratament al șancrului moale: vaccinoterapia cu vaccin specific sau autovaccin administrat intramuscular sau intravenos, sau aplicarea locală de substanțe caustice (fenol, acid cromic, clorură de zinc), cu scopul de a steriliza plaga.

Diagnosticul de laborator

Produsele de examinat sînt: secreția șancrului, recoltată din zona activă a șancrului și puroiul adenitei șancroase. Diagnosticul de laborator constă în punerea în evidență a germenului prin metode directe și o metodă indirectă.

1. *Metode directe*: a) Examinarea microscopică a produselor patologice pe frotiuri colorate dă rezultate pozitive în 43—65% din cazuri.

Frotiurile se colorează după metoda Gram sau Pick-Jacobsen (colorația de elecție a *H. ducreyi*).

Colorața Pick-Jacobsen folosește următorul amestec: albastru de metilen 8 picături, fucsină fenicată Ziehl 10—15 picături și apă distilată 20 ml; lamele, fixate, se acoperă cu acest amestec colorant, timp de 20 de minute. La examenul microscopic, fondul preparatului apare colorat în roz, iar germenii, colorați în albastru.

b) Însămînțarea produselor patologice pe medii propice dă rezultate pozitive în 60—90% din cazuri; produsele patologice se vor recolta, pentru însămînțare, dintr-o pustulă incipientă sau din șancrul de reinoculare, pentru a se înlătura flora microbiană asociată.

2. *Metoda indirectă. Intradermoreacția Ito* și *Reenstierna*, care constă în inocularea intradermică a 0,1 ml cultură de *H. ducreyi*, omorîtă prin căldură. În cazurile pozitive apare o papulă, înconjurată de o zonă de eritem. Pentru practicarea intradermoreacției s-au preparat diverse extracte de *H. ducreyi*, printre care și ducreina Nicolau și Banciu. Intradermoreacția are valoare retrospectivă, fiind pozitivă și la foștii bolnavi.

Epidemiologie

Șancrul moale este o infecție strict specifică omului, foarte contagioasă, care se transmite, de cele mai multe ori, prin contact sexual.

Infecția se întîlnește mai frecvent la bărbați decît la femei, în mediul urban, decît în cel rural.

La noi în țară, datorită îmbunătățirii continue a condițiilor igienico-sanitare ale populației și acțiunii de eradicare a bolilor venerice, apariția cazurilor de șancru moale constituie o excepție.

Vaccinul specific, administrat intradermic, se folosește atît pentru depistarea bolnavilor și a foștilor bolnavi, cît și pentru desensibilizarea față de antigenul specific.

*

Haemophilus aegyptius. A fost descris de Koch (1883), pe frotiuri efectuate cu secreții din infecții oculare; germenul a fost izolat în cultură pură, de Weeks (1889). *H. aegyptius*, avînd nevoie pentru dezvoltarea sa de factorii „X" și „V", a fost considerat, de unii autori, identic cu *H. influenzae*. Ulterior, rezultatele studiilor serologice și ale investigațiilor epidemiologice au demonstrat că este un germene deosebit de *H. influenzae*.

H. aegyptius este agentul patogen al conjunctivitei subacute epidemice (răspîndită în climatul cald).

Haemophilus suis. Se aseamănă cu *H. influenzae* prin faptul că prezintă aceleași exigențe nutritive (prezența factorilor „X" și „V"), însă se deosebește de acesta prin structură antigenică și o altă serie de proprietăți biologice.

În afară de rolul patogen important pe care-l are în asociere cu un virus gripal asemănător celui uman, în gripa porcină, *H. suis* este agentul patogen al bolii Glässer, la porci (boală caracterizată prin inflamația cavităților seroase).

Haemophilus haemolyticus (Pritchett și Stillman, 1919) crește în prezența factorilor „X" și „V" și are proprietatea de a hemoliza globulele roșii ale mai multor specii animale: iepure, berbec, om etc.

H. haemolyticus se găsește în arborele respirator al omului; în genere, este nepatogen; rareori cauzează endocardita subacută.

Haemophilus parahaemolyticus necesită, pentru dezvoltare, prezența factorului „V"; pe medii cu sînge produce o zonă de hemoliză, în jurul coloniilor.

H. parahaemolyticus are același habitat și prezintă aceeași patogenitate ca *H. haemolyticus*.

Haemophilus parainfluenzae a fost izolat din arborele respirator al omului (Rivers, 1922); în genere, este nepatogen. Se dezvoltă pe medii de cultură care conțin factorul V.

Haemophilus piscium a fost izolat de la păsări (Snieszko, 1950); este singura specie bacteriană cunoscută pînă în prezent din genul *Haemophilus* care afectează animale cu sînge rece.

H. piscium are nevoie, pentru dezvoltarea sa, de difosfotiamină sau adenozintrifosfat; a fost cultivat pe medii care conțin un extract de pește.

Genul Bordetella

Conf. N. Poszgi

Bordetella pertussis și tusea convulsivă

Genul *Bordetella* cuprinde germeni de formă cocobacilară, imobili sau mobili (*B. bronchiseptica*), gram negativi. La izolare necesită medii cu sînge. Sînt hemolitici și nu fermentează hidrații de carbon. Determină tusea convulsivă și infecții asemănătoare. Alături de *B. pertussis* au fost descrise în același gen, *Bordetella parapertussis* și *B. bronchiseptica*. Germenii din genul *Bordetella* fac parte din fam. *Brucellaceae*.

Istoric. Descrieri asupra unor epidemii de tuse convulsivă datează încă din secolul al XVI-lea, iar în 1679, Sydenham a dat afecțiunii numele de Pertussis. În 1900, Bordet și Gengou au descoperit agentul cauzal.

Habitat. *B. pertussis* are o afinitate electivă pentru epiteliul respirator; germenul rămîne cantonat și se dezvoltă la suprafața epiteliului laringelui, traheei, bronhiilor și a bronhiolelor. Germenul nu se găsește decît în boala umană : omul este singurul rezervor de germeni cunoscut.

Infectarea se face în special în perioada catarală a bolii, prin intermediul picăturilor de salivă proiectate în timpul tusei. Boala este răspîndită și de către purtătorii de germeni convalescenți (Stolzova-Suterisova) sau de bolnavii prezentînd forme atipice de boală.

Caractere morfologice. La izolare, *B. pertussis* se prezintă sub forma unui cocobacil de dimensiuni reduse: 1–1,5 μ lungime și 0,3–0,5 μ lățime. După cîteva treceri pe mediile solide cu sînge, poate lua aspectul unui coc; acest aspect corespunde cu o formă de rezistență reversibilă a germenului.

După numeroase treceri (150–180), germenul devine polimorf, prezentînd atît forme cocobacilare, cît și forme bacilare. Pe frotiuri, germenii apar izolați, în grupe mici, perechi sau lanțuri scurte. *B. pertussis* este gram-negativ; colorat cu fucsină diluată sau cu albastru de toluidină, prezintă granulații metacromatice bipolare.

Germenul este imobil, nesporulat și posedă, în special în exsudate și în culturile proaspete, o capsulă.

Examenele efectuate la microscopul electronic au arătat prezența unei mase centrale de material dens, înconjurate de o zonă mai puțin densă, care este membrana celulară. S-a constatat de asemenea prezența unor formațiuni nucleare sub forma unor mase mai dense, rotunde sau în arc.

După trecerea germenului prin plămînul de șoarece imunizat și după cultivarea germenilor pe medii, conținînd glicocol sau ser de cal, s-a constatat apariția de corpi globuloși.

Caractere de cultură. La izolare, *B. pertussis* se cultivă numai pe medii cu sînge; mediul preferat pentru izolare este mediul original al lui Bordet și Gengou. Pe acest mediu, germenul se dezvoltă în 48–78 de ore la 35–37°. Coloniile au un diametru de aproximativ 1 mm, sînt rotunde, cu marginile regulate; în lumina oblică prezintă o surafață lucioasă și un reflex metalic asemănător cu acela al unei picături de mercur sau al unei perle tăiate; în jurul coloniilor se constată o zonă caracteristică de hemoliză.

B. pertussis se poate cultiva pe medii fără sînge, păstrîndu-și toate proprietățile caracteristice. Aceste medii de cultură, solide sau lichide, trebuie să conțină săruri, aminoacizi — în special acid glutamic, acid aspartic, cistină și triptofan—acid nicotinic și o substanță adsorbantă : cărbune vegetal, amidon sau serumalbumină, care ar fixa acizii grași nesaturați toxici, rezultați în cursul metabolismului bacterian. După cultivarea pe geloză ordinară, conținînd cantități descrescînde de sînge, *B. pertussis* poate fi antrenată să crească pe medii obișnuite, însă în aceste condiții se degradează și își pierde complet caracterele de patogenitate și antigenitate.

Caractere biochimice și de metabolism. *B. pertussis* este un germen aerob; agitarea continuă favorizează creșterea în mediul lichid.

Temperatura optimă de dezvoltare este între 35 și 37°; pH optim 7,6–7,8.

B. pertussis nu fermentează glucidele; nu are acțiune proteolitică; nu reduce nitrații în nitriți; nu produce indol.

Cultivat pe lapte turnesolat, produce alcalinitate după 10–14 zile. Germenii proaspăt izolați sînt precipitați de fosfatul de aluminiu la pH 6,5; bila și hidratul de sodiu îi lizează.

B. pertussis posedă un echipament enzimatic complex; s-au pus în evidență: transaminaze, decarboxilaze, desaminaze, dehidrogenaze și oxidaze.

Germenul prezintă o respirație intensă, iar produșii de autointoxicație, rezultați din procesele respiratorii globale (H_2O_2), sînt eliminați grație activității catalazice.

Rezistența la agenții fizici, chimici și biologici. *B. pertussis* este puțin rezistent în afara organismului; germenul proaspăt izolat nu rezistă la temperatura camerei mai mult de două ore; suspendat în salivă, este mult mai rezistent. Lumina solară, razele ultraviolete, uscarea, îi scad considerabil rezistența. Încălzirea la 55° îl omoară în 30 de minute.

B. pertussis rezistă la acțiunea sulfamidelor și a penicilinei. Streptomicina, în concentrație de 3 γ/ml are acțiune bacteriostatică iar în concentrație de 15 γ/ml are acțiune bactericidă.

Germenul este foarte sensibil la acţiunea cloromicetinei care-i inhibează creşterea în doze de 0,16—8,0 γ/ml; teramicina este activă între 0,2 şi 15,5 γ/ml şi aureomicina în concentraţie de 0,16—12,5 γ/ml.

Structura antigenică. *B. pertussis* suferă în timpul cultivării pe mediile de cultură o serie de modificări ale structurii antigenice, modificări care au fost constatate încă de Bordet şi Sleeswyk în 1910, apoi de alţi cercetători.

Leslie şi Gardner (1931) au distins în cursul disociaţiei patru faze diferite: germenii în faza I şi a II-a sînt consideraţi „smooth" şi germenii în fazele a III-a şi a IV-a „rough".

B. pertussis în faza I creşte sub forma caracteristică de picătură de mercur, prezentînd o zonă de hemoliză în jurul coloniei; are aspectul cocobacilar şi posedă capsulă; se suspendă uşor în ser fiziologic şi suspensia obţinută este stabilă. Germenii în această fază sînt virulenţi, toxici, aglutinează pînă la titru cu serurile preparate cu germeni proaspăt izolaţi şi conţin antigene capabile să producă imunitate faţă de infecţia specifică.

Viteza de migrare la cataforeză a germenilor în faza I este de trei ori mai mare decît a germenilor în celelalte faze, iar punctul izoelectric este mai crescut. Precipită cu fosfatul de aluminiu la pH 6,5 şi sînt solubili în hidrat de sodiu şi în bilă.

Andersen (1953), Eldering şi colaboratorii (1956—1957) au demonstrat că germenii în faza I posedă:

1. un antigen O termostabil, comun cu *B. parapertussis* şi cu *B. bronchiseptica*;
2. un antigen K, termolabil, de asemenea comun pentru germenii genului *Bordetella*;
3. antigen K specific de tip, pe baza căruia tulpinile pot fi divizate în tipuri serologice diferite.

Aglutinogenul este unul din aceşti factori antigenici comuni.

Clasificarea germenului în tipuri serologice prin testele de aglutinare s-a dovedit importantă din punct de vedere epidemiologic, deoarece s-a constatat aceeaşi structură antigenică a tulpinilor izolate din acelaşi lanţ de infecţii.

Prezenţa germenilor în faza a II-a nu a putut fi confirmată.

În fazele a III-a şi a IV-a, *B. pertussis* creşte pe medii simple, fără sînge, formînd colonii brune şi opace; germenii sînt polimorfi, nehemolitici, în genere neîncapsulaţi; sînt avirulenţi şi posedă o cantitate redusă de toxină; produc aglutinine în titru redus şi nu sînt aglutinaţi de serurile preparate cu germeni în faza I; nu posedă antigene capabile să producă imunitate faţă de infectarea cu *B. pertussis*.

Schimbările constatate în antigenele de suprafaţă ale germenilor fazei I, în cursul disociaţiei, ar putea fi legate de rearanjarea antigenelor în proporţii diferite, de modificarea lor sau de apariţia de noi antigene.

Prin metode fizice şi chimice s-au izolat din *B. pertussis* o serie de fracţiuni antigenice: aglutinogenul, toxina termolabilă, toxină termostabilă, hemaglutinina, antigenul protector şi antigenul sensibilizant la histamină.

Aglutinogenul este un antigen de suprafaţă, de natură proteică. Aglutinogenul purificat este foarte antigenic: inocularea a cîteva zecimi de miligram determină la iepure producerea de anticorpi aglutinanţi în titruri importante. Nu protejează faţă de inocularea intracerebrală a tulpinilor virulente de *B. pertussis*.

Aglutinogenul este lipsit de toxicitate; o cantitate de 5 mg intraperitoneal nu omoară şoarecii; iepurii inoculaţi cu cantităţi mari de aglutinogen nu prezintă fenomene clinice şi nici alterări anatomice; inoculat intradermic la iepuri normali sau la copiii care nu au avut tuse convulsivă, nu determină nici o reacţie. Aglutinogenul poate fi folosit în testul cutanat, pentru detectarea susceptibilităţii copiilor la tuse convulsivă şi evaluarea eficacităţii vaccinurilor.

Toxina a fost pusă în evidenţă de Bordet şi Gengou (1909) şi de Klimenko (1909); ea conţine două fracţiuni toxice distincte: fracţiunea termolabilă, foarte activă şi toxina termostabilă, cu activitate slabă.

Toxina termolabilă de natură proteică, se distruge în 30 de minute, la 56° şi în 24 de ore la temperatura laboratorului; ea poate fi transformată în anatoxină prin detoxifiere cu formol. Anatoxina inoculată la animale provoacă apariţia de antitoxine capabile să neutralizeze toxina *in vitro* şi să protejeze animalele faţă de acţiunea acesteia. Toxina inoculată pe cale intradermică la cobai şi iepuri determină apariţia unui edem hemoragic urmat de necroză; o doză slabă de toxină produce o zonă de hemoragie fără necroză, iar o doză puternică caşectizează şi omoară animalul. Toxina intervine în simptomatologia tusei convulsive; antitoxina poate proteja faţă de efectele toxinei.

Inocularea animalelor de laborator cu toxină, pe cale intravenoasă, intraperitoneală, intranazală sau intratraheală, provoacă moartea prin leziuni vasculare generalizate.

Toxina inoculată pe cale intracerebrală la cobai, iepuri, cîini realizează un tablou clinic şi anatomic comparabil cu cel al encefalitei, care se observă în cursul tusei convulsive.

Toxina termostabilă (endotoxina), de natură lipo-polizaharidică, a fost pusă în evidenţă de Flosdorf şi colaboratorii (1939); inoculată pe calea intradermică produce o zonă de edem cu induraţie, însoţită de peteşii neconfluente, fără necroză. Are un efect adjuvant-stimulator asupra producerii de anticorpi.

Hemaglutinina a fost obţinută (1947) din tulpinile de *B. pertussis* în faza I; este un antigen de suprafaţă, capabil să aglutineze hematiile umane şi animale. Poate fi găsită în supernatantul culturilor în mediu lichid şi poate fi extrasă uşor din culturile tinere.

Hemaglutinina este distrusă prin încălzire 30 de minute la 56°; se distruge repede chiar la temperaturi joase. În cursul evoluţiei tusei convulsive se poate constata în serul copiilor o creştere a titrului antihemaglutininelor.

Antigenul protector a fost obţinut de Pillemer şi colaboratorii (1954) prin dezintegrarea sonică a germenilor. S-a constatat că această fracţiune posedă, pe lîngă o activitate protectoare şi o activitate sensibilizantă la histamină (*factorul sensibilizant la histamină FSH*). Antigenul protector şi factorul sensibilizant la histamină sînt localizaţi în peretele celular şi nu au putut fi separaţi unul de altul. Au aceeaşi mobilitate electroforetică, precipită la pH 4,9, şi cu aceeaşi concentraţie de acetonă şi alcool.

Valoarea antigenului protector adsorbit pe stroma globulelor este similară cu aceea a suspensiei bacteriene.

Puterea protectoare a vaccinului este corelată cu activitatea histamino-sensibilizantă; preparate purificate de antigen protector + FSH au capacitatea de a sensibiliza față de histamină, de a crește permeabilitatea capilarelor și de a mări răspunsul în anticorpi.

FSH este distrus prin încălzire la 75° timp de 30 de minute și prin tratare cu formol la 37°. Formolul reduce și activitatea antigenului protector; mertiolatul de sodiu conservă activitatea celor două componente. Din datele experimentale rezultă deci, că FSH este foarte strîns legat de antigenul protector.

Factorul sensibilizant la histamină a fost găsit numai la *B. pertussis*, ceilalți germeni ai genului *Bordetella* nu posedă acest factor.

Caractere de patogenitate. *B. pertussis* prezintă în genere o *virulență* scăzută atît pentru om, cît și pentru animalele de laborator. La om, germenul se localizează și se multiplică la suprafața mucoasei căilor respiratorii, unde produce necroza și descuamația celulelor; germenii nu invadează sîngele.

Cu tulpinile virulente se pot infecta o serie de animale, cum ar fi: maimuțele, cîinii, șobolanii și șoarecii.

Toxigeneza. Toxina *B. pertussis* determină în cursul bolii la om leziuni inflamatoare și iritative la nivelul laringelui, traheei și bronhiilor, secundar o reacție alveolară emfizematoasă și în unele cazuri alveolită exsudativă. Dobrohotova a arătat că toxina provoacă de asemenea tulburări vasomotorii: spasme și pareze ale capilarelor, alterări ale endoteliilor vasculare și tulburări nervoase (Soboleva, 1948).

Boala la om. După o perioadă de incubație care durează între 7 și 14 zile, tusea convulsivă evoluează prezentînd trei perioade distincte: perioada catarală, perioada cvintelor și perioada de convalescență.

Perioada catarală durează în medie 10–14 zile; la sugari este mai scurtă și se manifestă prin simptome reduse, simulînd o răceală cu strănut, traheobronșită cu tuse uscată. Tusea devine mai frecventă noaptea, fără a prezenta caracter cvintos. Leziunile histologice se caracterizează prin infiltrația epiteliului respirator cu leucocite polimorfonucleare.

Perioada de cvinte sau convulsivă începe o dată cu apariția cvintelor caracteristice. Cvinta de tuse se compune din tuse, repriză și expectorație. Accesele grave cuprind mai multe reprize și se întovărășesc de un zgomot caracteristic; la sfîrșitul cvintelor se produc uneori vărsături. În tusea convulsivă se produce leucocitoză, numărul leucocitelor variind în medie între 10 000 și 20 000/ml, cu limfocitoză de 60–80%.

Infecția experimentală. Tusea convulsivă a fost realizată experimental la maimuțe, care fac o boală comparabilă cu a omului.

Șoarecii inoculați pe calea intranazală sau intratraheală fac o boală caracterizată prin leziuni de bronhopneumonie. Histologic se constată: infiltrații peribronhiale și perivasculare, cu mononucleare și polimorfonucleare; proliferarea, descuamarea și degenerescența epiteliului bronhial.

În urma inoculării unei doze reduse de germeni la șoareci pe calea intracerebrală, se produce îmbolnăvirea acestora și moartea după 4–14 zile de la inoculare. Germenul se înmulțește în creier.

Inocularea culturilor de *B. pertussis* la șoareci mărește considerabil sensibilitatea acestora la histamină.

Imunitatea. Tusea convulsivă conferă o imunitate durabilă pentru toată viața.

Imunitatea în tusea convulsivă este antibacteriană. Toxina joacă un rol în apariția unora dintre semnele clinice, nu intervine însă în producerea imunității.

Pînă în prezent nu se cunoaşte precis care este antigenul protector : se consideră că protejează aglutinogenul, hemaglutinina, antigenul protector al lui Pillemer, însă problema nu este încă rezolvată.

În serul bolnavilor de tuse convulsivă şi al convalescenților se găsesc : anticorpi aglutinanți, anticorpi fixatori, antihemaglutinine, precipitine, opsonine şi anticorpi protectori.

Testul de protecție al şoarecilor efectuat cu serul bolnavilor este pozitiv în 90% din cazuri la 3 săptămîni după debutul cvintelor.

La vechii bolnavi, anticorpii protectori persistă în 35% din cazuri. Serul bolnavilor şi al convalescenților nu conține decît cantități neînsemnate de antitoxine.

Tratamentul specific constă în administrarea serului imun anti-*pertussis* sau a γ-globulinei specifice.

Se folosesc seruri hiperimune umane sau seruri hiperimune de cal, iepure ; în ultimul timp γ-globulina specifică a înlocuit serurile native.

Serul hiperimun se administrează în doza de 60 ml, repartizați în cel puțin trei doze, iar γ-globulina se inoculează în 3 doze a cîte 5 ml la 24 de ore interval.

Tratamentul cu ser sau cu γ-globulină are valoare optimă în perioada catarală ; cînd s-au instalat cvintele, efectul tratamentului specific este foarte redus.

Seroterapia s-a dovedit de un efect salutar în unele forme de tuse convulsivă complicată, cum ar fi spasmul glotei, cvintele asfixiante şi pneumonia interstițială.

Rezultatele cele mai bune se obțin cînd se administrează γ-globulină şi antibiotice.

Diagnosticul de laborator

Constă în izolarea germenului de la bolnavi şi identificarea sa.

Izolarea germenului se face prin următoarele tehnici :

1. Însămînțarea directă, pe plăci Petri conținînd mediul Bordet, a stropilor baciliferi proiectați de bolnav în timpul tusei (Chiewitz şi Meyer, 1916). Prelevările trebuie efectuate dimineața pe nemîncate; plăcile Petri se expun în timpul tusei — în special spre sfîrşitul accesului de tuse —la o distanță de aproximativ 20 cm de gura bolnavului.

2. Sputa eliminată în timpul unui acces de tuse se recoltează în recipiente sterile. Însămînțarea trebuie efectuată imediat sau la un interval cît mai scurt după recoltarea sputei. Din spută se aleg cu ansa fragmentele vîscoase, albicioase, se spală în ser fiziologic şi se însămînțează pe plăci Petri cu mediul Bordet.

3. Se recoltează secreția nazo-faringiană cu ajutorul unui tampon fixat pe o tijă metalică flexibilă. Tija se introduce în orificiul nazal pînă ce atinge peretele posterior al faringelui. Tamponul încărcat se epuizează

pe plăci Petri conținînd mediul Bordet; materialul este apoi întins pe suprafața mediului cu o ansă de platină.

4. Se prelevă mucusul nazo-faringian cu ajutorul unei sonde de cauciuc, montată la o seringă de 50 ml. Sonda se introduce încet pînă la peretele posterior al faringelui; se practică o aspirație puternică a mucusului, care se însămînțează apoi în cutii Petri cu mediul Bordet.

Mediul Bordet-Gengou se prepară în felul următor: la 1 kg cartofi tăiați mărunt, se adaugă 2 l de apă distilată, glicerinată 4%; se sterilizează la autoclav 20 de minute la 120°. Se filtrează prin vată, pînă ce se obține un lichid foarte clar. Se amestecă părți egale de macerat de cartof și de apă distilată; se adaugă ClNa $5^0/_{00}$ și geloză 4%. Se topește geloza în maceratul de cartofi la autoclav la 100°; se repartizează în tuburi și se sterilizează 30 de minute la 100°. În momentul folosirii, se adaugă 25—30% sînge defibrinat de om sau de berbec.

Pentru inhibarea florei asociate se recomandă să se adauge mediului de cultură, 15—20 de unități de penicilină pe ml sau se trece tamponul încărcat peste o picătură cu soluție de penicilină depusă pe suprafața mediului.

Mediile însămînțate sînt incubate la 35—37°, timp de 48—72 ore, cînd pot fi decelate coloniile de *B. pertussis*.

Coloniile de *B. pertussis* trebuie diferențiate de coloniile de *Haemophilus influenzae*, *B. parapertussis*, *Neisseria catharralis* și *B. bronchiseptica* (care se izolează de la om în mod excepțional). Deoarece acești germeni se dezvoltă mai repede, plăcile trebuie să fie examinate și după 24 de ore de incubare.

Haemophilus influenzae prezintă colonii plate transparente cu aspectul de picătură de rouă; după colorarea cu metoda Gram, germenul prezintă un polimorfism accentuat, prezentînd forme cocoide, bacilare și filamente.

B. parapertussis produce colonii foarte asemănătare cu cele de *B. pertussis*, se caracterizează însă prin pigmentarea mediului subiacent.

Neisseria catharralis prezintă colonii asemănătoare, friabile, alunecînd din ansa de platină; după colorare se prezintă sub formă de coci gram-negativi, grupați în perechi sau tetrade.

Metoda bacteriologică de diagnostic a tusei convulsive permite izolarea germenului în următoarele procente medii, în perioada catarală:

— în I-a săptămînă de evinte în 90—100% din cazuri
— în a II-a „ „ „ 60— 70% „ „
— în a III-a „ „ „ 30— 35% „ „
— în a IV-a „ „ „ 10— 20% „ „

Identificarea germenilor izolați se face prin cercetarea caracterelor morfologice, de cultură, biochimice și serologice.

Diagnosticul serologic constă în punerea în evidență a anticorpilor specifici în serul bolnavilor.

Aglutininele apar în majoritatea cazurilor în a 3-a săptămînă de evinte, la 50% dintre bolnavi. În săptămînile următoare se constată titruri aglutinante la peste 90% dintre bolnavi. Apariția tardivă a aglutininelor face ca ele să nu prezinte o valoare diagnostică.

Anticorpii fixatori apar la sfîrșitul celei de a 2-a săptămîni de boală; titrurile maxime au fost observate între a 4-a și a 9-a săptămînă. Anticorpii fixatori persistă cîteva luni după boală.

Indicele opsono-citofagic crește din primele zile ale perioadei catarale, putînd astfel constitui un mijloc de diagnostic precoce.

Tabelul LX

Caracterele diferențiale ale genului Bordetella

	Morfologia pe mediul Bordet-Gengou	sula	Cultură pe geloză ordinară	Reducerea nitraților	Dezintegrarea ureei	Producerea de pigment pe geloză sau pe 0,1% tiamină	Aglutinarea cu:	
							Ser hiperimun anti-*B. pertussis*	Ser anti-*B. parapertussis*
Bordetella pertussis	Cocobacil	+	−	−	−	−	++	±
Bordetella parapertussis	Bastonaș	−	+	−	+	+	−±	++
Bordetella bronchiseptică	Cocoid	−	+	+	+	−	−	−

În tusea convulsivă, imunitatea este însoțită de o stare de alergie, ceea ce a determinat pe numeroși cercetători să încerce punerea la punct a unui test cutanat de diagnostic.

Aglutinogenul (Flosdorf) inoculat intradermic produce o reacție pozitivă în convalescență. Reacția se citește după 24 de ore și constă dintr-o zonă de indurație, întovărășită sau nu de eritem. Acest test nu permite să se pună un diagnostic precoce.

Epidemiologie

Tusea convulsivă este o boală endemică cu puseuri epidemice: epidemiile apar la intervale de 4–5 ani.

Procentul morbidității este mai mare la copii mici; după datele statistice din majoritatea țărilor reiese că 80% din totalul îmbolnăvirilor revin vîrstei pînă la 5 ani, restul de 20% interesează copiii pînă la 15 ani. De la această vîrstă, nu se mai produc decît îmbolnăviri sporadice; la adulți, tusea convulsivă se prezintă în genere sub formă frustă.

Letalitatea este mai mare la sugari; în general, repartiția pe grupele de vîrstă evoluează paralel cu morbiditatea.

Tusea convulsivă este foarte contagioasă: procentul infectării familiale este de 85–90%; în mediul școlar apar 25–50% cazuri.

Contagiunea maximă se produce în perioada catarală; după apariția cvintelor, contagiunea scade; se consideră, în genere, că după 4 săptămîni, tusea convulsivă nu mai este contagioasă.

Profilaxia specifică se face prin imunizarea activă și prin imunizarea pasivă.

Imunizarea activă constă în administrarea de vaccinuri monovalente, fluide și adsorbite, sau de vaccinuri asociate.

Vaccinurile microbiene sînt constituite din suspensii de germeni detoxifiați și omorîți cu formol sau cu mertiolat de sodiu, la o concentrație de 20—30 miliarde germeni/ml. Aceste vaccinuri se administrează în 3 injecţii, subcutanat, la 30 de zile interval.

Vaccinurile microbiene adsorbite sînt preparate din suspensii de germeni, cărora li se adaugă o substanţă adsorbantă : alaun de potasiu, fosfat de aluminiu sau hidroxid de aluminiu, cu rol de adjuvant al imutăţii. Aceste vaccinuri se administrează pe cale intramusculară.

Vaccinurile asociate — trivaccinurile — sînt preparate din suspensii de *Bordetella pertussis*, anatoxină difterică şi anatoxină tetanică, cu sau fără adsorbant.

Vaccinurile asociate se administrează în 3 doze, la 30 de zile interval.

Indiferent de vaccinul folosit, se recomandă să se facă o doză de rapel după 1—2 ani.

Vîrsta cea mai indicată pentru vaccinarea contra tusei convulsive este aceea a primelor 6 luni de viaţă.

Vaccinurile *antipertussis* determină un efect profilactic însemnat. Procentul copiilor vaccinaţi, care nu se îmbolnăvesc în mediu contaminat variază, după cercetători, de la 75% la 98%. Restul copiilor vaccinaţi, care nu se imunizează suficient pentru a fi protejaţi, prezintă o formă de boală uşoară şi nu fac complicaţii.

Imunizarea pasivă se face prin administrarea de seruri hiperimune sau a γ-globulinei specifice. Se administrează 40 ml ser hiperimun de om, repartizat în două doze, la 3—5 zile interval, sau 5—10 ml γ-globulină.

Bordetella parapertussis

A fost izolată de Eldering şi Kendrick în 1937 din cazuri clinice de tuse convulsivă.

Caractere morfologice. *B. parapertussis* este un cocobacil ovoid, gram-negativ, imobil, foarte asemănător cu *B. pertussis*. Nu posedă capsulă.

Caractere de cultură. Pe mediul Bordet se dezvoltă în 24 de ore, formînd colonii asemănătoare cu cele de *B. pertussis*, însă mai mari şi prezentînd o zonă pigmentată brună în jur cu hemoliză. Pigmentarea se poate pune mai bine în evidenţă prin cultivarea germenului pe medii care conţin 0,1% l-tirozină.

Nu se poate izola pe mediu fără sînge. Ulterior se poate cultiva pe agar simplu şi pe medii lichide fără sînge; pe cartof produce, după 48 de ore, o pigmentare brună.

Caractere biochimice. *B. parapertussis* nu fermentează carbohidraţii, nu produce indol; nu produce hidrogen sulfurat; nu reduce nitraţii; dezintegrează ureea; produce o cantitate importantă de catalază; utilizează citratul ca unică sursă de carbon; alcalinizează laptele turnesolat în 1—2 zile.

Punerea în evidenţă a capacităţii de pigmentare brună a mediilor de cultură, în special în prezenţa l-tirozinei, constituie un mijloc de diferenţiere pentru *B. parapertussis* de ceilalţi germeni din genul *Bordetella*.

Structura antigenică. *B. parapertussis* posedă un antigen somatic „O", comun cu *B. pertussis* şi cu *B. bronchiseptica*, un antigen „K" comun, un antigen „K" specific de specie şi o toxină hemoragică şi dermonecrotică comună.

Virulenţa este asemănătoare cu aceea a *B. pertussis*, iar toxina este mai puţin activă.

Boala la om începe cu o perioadă de incubaţie de 6—15 zile, după care urmează perioada de stare, cu tuse spasmodică, dar mai puţin severă decît în tusea convulsivă cu *B. pertussis*. Vărsăturile sînt rare.

Boala durează 1—3 săptămîni. În general nu se produc complicaţii.

Infecţia experimentală la şoarece se caracterizează prin leziuni pulmonare, asemănătoare celor produse de *B. pertussis* însoţite de leucocitoză moderată.

Imunitatea. Prin teste de protecţie încrucişată s-a constatat o slabă acţiune imunizantă a antigenelor *B. parapertussis* faţă de infecţia cu *B. pertussis*; de asemenea, îmbolnăvirea cu *B. parapertussis* nu conferă copiilor imunitate faţă de acest germen şi invers.

Epidemiologie. În ultimii ani s-au descris numeroase epidemii cu *B. parapertussis*; în acelaşi timp s-au decelat anticorpi anti-*parapertussis* în serul a numeroşi copii şi adulţi sănătoşi, ceea ce indică că îmbolnăvirile cu *B. parapertussis* au o largă răspîndire.

Bordetella bronchiseptica

A fost izolată în acelaşi an (1911) de Ferry şi de Mc. Gowan, într-o epizootie canină.

B. bronchiseptica prezintă un grad de patogenitate redus pentru om, de la care se izolează în mod excepţional; germenul a fost izolat numai în cîteva cazuri, care prezentau o simptomatologie clinică de tuse convulsivă.

Caractere morfologice. Din punct de vedere morfologic, *B. bronchiseptica* se aseamănă cu *B.pertussis*; germenul este gram-negativ, mobil, posedînd 4—6 cili peritrichi, nesporulat.

Caractere de cultură. Se izolează pe medii cu sînge şi se cultivă ulterior pe medii simple, fără sînge.

Coloniile sînt mici, rotunde, convexe, cu suprafaţa lucioasă. În bulion creşte rapid, producînd o peliculă cenuşie, şi sediment.

Caractere biochimice. *B. bronchiseptica* nu fermentează glucidele; nu produce hidrogen sulfurat; nu produce indol; produce amoniac din uree şi asparagină; reduce nitraţii în nitriţi; utilizează citratul ca unică sursă de carbon; alcalinizează laptele turnesolat în 1—2 zile.

Structura antigenică. *B. bronchiseptica* posedă un antigen „O" şi un antigen „K" comun pentru germenii genului *Bordetella* şi un antigen „K" specific de specie.

B. bronchiseptica este mai strîns înrudită cu *B. pertussis* decît *B. parapertussis* cu *B. pertussis*; şoarecii imunizaţi cu antigene preparate din *B. pertussis* şi *B. bronchiseptica* au prezentat un grad de imunitate încrucişată.

Antitoxina preparată cu toxina formolată a *B. bronchiseptica* neutralizează toxinele celor trei specii de germeni.

Genul Pasteurella

Dr. Marcella Popovici

Pasteurella pestis și infecția pestoasă

Pasteurella pestis este agentul cauzal al pestei, boală comună omului și animalelor, întîlnită mai ales la rozătoarele domestice și sălbatice, limitată astăzi numai la unele regiuni ale globului pămîntesc, unde îmbracă mai ales forma de pestă „silvatică".

Clasificare. *Pasteurella pestis* face parte din genul *Pasteurella*, familia *Brucellaceae*.

Genul *Pasteurella* cuprinde o serie de specii microbiene asemănătoare ca morfologie, dar prezentînd unele deosebiri ale caracterelor de cultură și biochimice, agenți cauzali ai unor boli septicemice hemoragice, unele comune omului și animalelor, altele cu patogenitate de specie, bine determinată.

Sînt cuprinse în acest gen următoarele specii:

1. Specii capabile să crească pe medii obișnuite:

— *Pasteurella multocida*: imobilă, producătoare de indol și H_2S, nu lichefiază gelatina; agent cauzal al holerei puilor de găină și septicemiei hemoragice a animalelor cu sînge cald.

— *Pasteurella septicaemiae*: imobilă; produce indol și H_2S; lichefiază gelatina; determină o septicemie la bobocii de gîscă.

— *Pasteurella haemolytica*: imobilă, nu produce indol, fermentează lactoza, hemolizează sîngele; cauzează pneumonie la oi și vite.

— *Pasteurella anatipestifer*: imobilă, nu produce indol, nu fermentează lactoza, lichefiază gelatina, izolată din cazuri de septicemie la boboci de rață.

— *Pasteurella pestis* imobilă, nu produce indol, nu lichefiază gelatina, reduce nitrații în nitriți, agent cauzal al pestei.

— *Pasteurella pfaffii*: imobilă, nu produce indol, nu lichefiază gelatina, nu reduce nitrații în nitriți; patogen pentru canari, papagali, șoareci, cobai și iepuri, unde produce septicemii epidemice sau enterite necrotice.

— *Pasteurella pseudotuberculosis* : imobilă la 37°, mobilă la 18—26°, nu lichefiază gelatina, nu produce indol; agent cauzal al pseudotuberculozei la diferite animale ca : vacă, cal, capră, iepure, cobai, șoarece, șobolan, cîine, pisică, precum și la unele păsări.

2. Specii care nu cresc pe medii obișnuite și care necesită pentru a se dezvolta medii speciale :

Pasteurella tularensis : agent cauzal al tularemiei.

Pasteurella novicida : patogen pentru șoareci albi, cobai și hamsteri.

S-a socotit necesară prezentarea clasificării genului *Pasteurella*, deoarece, pe de o parte identificarea *P. pestis*, necesită adeseori un diagnostic diferențial cu aceste variate specii, iar pe de altă parte, pentru că o serie de boli întîlnite la animalele de laborator, se datoresc speciilor din acest gen.

Istoric. Pesta pare a fi existat ca boală din timpuri foarte vechi, fiind semnalată chiar înaintea erei noastre.

După unii istoriografi, leagănul pestei ar fi fost în platoul central al Asiei, după alții în Africa centrală.

Diferitele epidemii și pandemii, care s-au succedat, au atras atenția cronicarilor, medicilor, poeților, artiștilor din acele timpuri, boala impresionînd prin extrema difuzibilitate și prin milioanele de victime pe care aceasta le-a pricinuit umanității. Între anii 1500 și 1720 s-au semnalat 45 de pandemii.

Declinul pestei a început în secolul al XVII-lea, o dată cu progresele civilizației și cu îmbunătățirea condițiilor igienice.

Agentul cauzal al pestei, *P. pestis* a fost izolat în 1894, simultan și independent de către Kitasato și Yersin.

Caractere morfologice. *P. pestis* se prezintă sub formă de bastonaș, scurt și gros, un cocobacil de 1,5 μ lungime pe 0,7 μ grosime, cu capetele rotunjite și marginile convexe, dispus singur, în lanțuri scurte sau în grupuri mici. În puroi, ca și în culturi pe geloză, dezvoltate la 37°, prezintă un polimorfism accentuat.

În culturi vechi are tendință la forme de involuție cu aspecte variate : ovalare, sferice, în măciucă, forme filamentoase etc. Tendința la morfologia aberantă este accentuată prin cultivarea în medii conținînd 3% NaCl (Hankin și Leumann).

Sub influența tratamentului cu sulfamide, s-a observat de asemenea apariția de forme de involuție.

Imobil, nesporulat, poate prezenta în produsele patologice și mai ales în culturi pe geloză-ser, o adevărată capsulă (Rowland, Schütze etc.). Este gram-negativ, fixînd colorantul bipolar.

Caractere de cultură. *P. pestis* crește pe medii obișnuite de cultură, dezvoltîndu-se încet și producînd culturi puțin abundente. În bulion tulbură slab sau de loc mediul, dar produce un depozit floconos la fundul tubului. Culturile vechi au un aspect clar, cu depozit abundent greu detașabil prin agitare.

Însămînțat în bulion-ulei de vaselină în anaerobioză relativă, crește în văl la suprafața de separare a celor 2 lichide. După incubare prelungită cîteva zile, se detașează de la nivelul vălului filamente care cad în profunzimea mediului, asemenea unor stalactite. Acest aspect a fost considerat inițial ca absolut caracteristic pentru *P. pestis*. Ulterior Schütze (1928) a arătat că și forma „R” a *P. pseudotuberculosis*, produce în bulion culturi floconoase, iar mai recent Wats și Puduval (1940) au demonstrat că formele „S” ale *P. pestis* tulbură uniform mediul.

Pe geloză, după o incubare de 24de ore la 37°, dezvoltă colonii foarte mici, de 0,1—0,2 mm diametru, rotunde, incolore, transparente, asemănătoare picăturilor de rouă, cu centrul granular și marginea închisă. După incubare 48 de ore se pot distinge două tipuri de colonii: tipul I, sînt net limitate de margini tăiate drept, cu suprafața ridicată, de culoare albă-gri la lumina reflectată și albăstruie la lumina directă; tipul al II-lea, sînt mai mari, cu un nucleu central și o zonă periferică ondulată. Cele 2 tipuri de colonii ar corespunde tipurilor „S” și „R”.

O problemă mult controversată a fost aceea dacă *P. pestis* dezvoltă în mod normal forma netedă „S” sau pe cea rugoasă „R” și care sînt relațiile dintre aceste forme și virulența germenului. Wats și Puduval (1940) au obținut atît din culturi vechi de laborator, cît și din culturi primare izolate din puroi sau din sînge, disociația în forma „S” virulentă și forma „R” avirulentă.

Pe gelatină, după incubare la 20—22°, timp de 2 sau 3 zile se observă colonii mici, semitransparente, cu relief central și margini ondulate.

Pe ser coagulat produce o cultură mai abundentă decît pe agar.

Pe mediu de cartof, se dezvoltă încet, producînd după 7 zile de incubare la 22°, un strat subțire de cultură.

Caractere biochimice și de metabolism. Aerob și facultativ anaerob, *P. pestis* se dezvoltă în limite largi de temperatură, între —2° și +45°, temperatura optimă fiind aceea de 27—28°, care permite o creștere de 4—5 ori mai abundentă decît cea de 37°.

Limitele de pH care permit dezvoltarea sînt între 5 și 9,6 cu un optim la pH 7,2.

Sîngele defibrinat, serul, ascita, ca și sulfatul de cupru sau sulfitul de sodiu, adăugate în anumite proporții la mediile de cultură, favorizează creșterea culturilor de *P. pestis*.

Schütze (1929) și mai tîrziu Wright (1934) au demonstrat acțiunea inhibitoare a oxigenului asupra dezvoltării *P. pestis*, acțiune pe care au atribuit-o formării de peroxid de hidrogen.

Adăugarea de sînge, ser, sau sulfit de sodiu, la mediul de cultură, s-a dovedit însă capabilă să reducă efectul nociv al oxigenului. Herbert (1949) a explicat acțiunea favorabilă a sîngelui prin aceea că fierul conținut în pigmentul sanguin stimulează producerea de catalază bacteriană, capabilă să descompună peroxidul de hidrogen format.

Unele tulpini necesită prezența de factori de creștere: nicotinamidă, tiamină, cistină, fenilalanină etc.

Tulpinile de *P. pestis* fermentează fără producere de gaz glucoza, maltoza, manita, salicina, arabinoza și xiloza. Sînt lipsite de acțiune fermentativă asupra lactozei, zaharozei, ramnozei, inozitei, sorbitei și glicerolului.

Lipsa de fermentare a ramnozei constituie un caracter diferențial față de *P. pseudotuberculosis* capabilă să fermenteze acest hidrat de carbon. Korobkova (1937) a obținut varietatea ramnozo-pozitivă sub influenţa bacteriofagului. În ce priveşte fermentarea glicerolului s-au descris de asemenea variante „glicerol-pozitive".

Nu lichefiază gelatina, nu coagulează laptele, nu reduce albastrul de metilen, nu produce indol şi nu descompune ureea.

Reacţia roşului de metil este pozitivă, iar reacţia Voges-Proskauer negativă. Reduce nitraţii în nitriţi, elaborează catalază şi produce foarte slab H_2S. Nu are acţiune hemolitică.

Rezistenţa la agenţi fizici, chimici şi biologici. Culturile pe agar, expuse luminii solare, sînt omorîte în 3—4 ore (Ogata, 1897). La 37° sau la temperatura camerei, culturile trăiesc cîteva zile. Păstrate în tuburi ermetic închise, la întuneric şi la 5—10° culturile pot supravieţui şi cîţiva ani (Francis, 1949) iar la —4° trăiesc cîteva luni. În puroi, spută, la temperatura camerei, germenii trăiesc 8—14 zile. În dejecţiile de purice, conservate în tuburi închise ermetic, germenii au fost găsiţi vii peste un an.

În splina de cobai infectat, păstrată în glicerină neutră la —15°, *P. pestis* îşi păstrează virulenţa ani de zile (Francis, 1939). La cadavru, germenul supravieţuieşte săptămîni şi chiar luni, iar în sol 2 — 30 de zile.

În culturi, *P. pestis* moare la 55° în 15 minute. Fenolul 5% o omoară imediat, iar în concentrăţie de 0,5% în 15 minute. Lizolul 1/50, laptele de var 1/10 şi clorura mercurică s-au arătat capabile să sterilizeze sputele infectate în 20 de minute.

Fadeeva şi Cernobaev prin studii sistematice au pus în evidenţă acţiunea inhibitoare asupra *P. pestis* a unei întregi serii de specii microbiene, printre care: *Streptococcus mucosus*, *Pneumococus*, *Esch. coli*, *S. typhi*, *Cromobacterium prodigiosum*, *Pseudomonas pyocyanea*, *Vibrio cholerae*, *B. mesentericus*, la care Tumansky a adăugat *Proteus vulgaris*.

S-au descris tulpini sensibile la acţiunea bacteriofagilor. S-au izolat bacteriofagi antipestoşi, din produse patologice recoltate de la bolnavi (puroi, materii fecale, sînge).

Este sensibil la acţiunea sulfamidelor. Dintre antibiotice, streptomicina se arată deosebit de activă. Aureomicina şi cloramfenicolul sînt de asemenea active, în timp ce penicilina este fără efect.

Structura antigenică. Rowland (1910) a descris prezenţa unui înveliş gelatinos, la germenii cultivaţi la 37°. Ulterior, Schütze (1932) a descris două antigene distincte, un antigen de înveliş dezvoltat mai bine în culturi crescute la 37°, termolabil şi un antigen somatic care se dezvoltă şi la 20° şi la 37°, termostabil. Ambele antigene pot fi prezente şi la formele virulente, ca şi la cele avirulente. Mai tîrziu, Baker şi colaboratorii (1947), studiind structura chimică a acestor antigene, au obţinut prin extracţie salină din organisme uscate prin acetonă, o fracţie solubilă în apă şi una insolubilă. În fracţiunea hidrosolubilă au diferenţiat 3 componenţi antigenici: o fracţiune glucido-proteică şi o proteină, ambele antigenice şi netoxice pentru şoarece, corespunzînd se pare antigenului capsular Schütze, precum şi o proteină toxică pentru şobolani şi şoareci, obţinută impură, cu proprietăţi imunogene nedeterminate. Antigenul somatic, insolubil în apă, este puţin cunoscut din punct de vedere chimic şi imunologic. El pare similar cu unul din antigenele somatice ale *P. pseudotuberculosis*.

Antigenul capsular aglutinează în flocoane în prezenţa antiserului specific. Are rol esenţial în imunizarea activă (Schütze).

Caractere de patogenitate. *P. pestis* își datorește acțiunea sa patogenă virulenței și mai puțin toxicității sale.

Virulența acestui germen este în general ridicată. Într-o experiență devenită clasică, Barber (1912) a obținut o infecție mortală la 6 cobai din 9 și 2 maimuțe din 12, după inocularea unui singur germen, rezultate confirmate mai tîrziu de Otten (1933). Pe de altă parte, virulența *P. pestis* s-a dovedit stabilă, circa 92% din tulpini păstrîndu-și neschimbată virulența ani de zile.

Prin subculturi repetate se pot obține variante avirulente (Otten). Sub influența bacteriofagului, Pokrovskaia (1934—1935) și Korobkova (1937) au obținut de asemenea variante avirulente.

Prin treceri repetate prin animale sensibile se obține redobîndirea și chiar exacerbarea virulenței. Conservarea culturilor la temperaturi joase sau în stare liofilizată permite păstrarea virulenței acestora. Virulența pare a fi în legătură cu prezența substanței de înveliș, capabilă să împiedice fagocitoza (Schütze).

Burrows și Bacon au definit caracterele tulpinilor virulente de *P. pestis*: prezența antigenelor V W, rezistența la fagocitoză, dezvoltarea de colonii pigmentate, pe medii cu hemină, capacitatea de a sintetiza purinele.

Toxigeneză. *P. pestis* nu elaborează o toxină difuzibilă. Proprietățile toxice ale *P. pestis* par legate de endotoxină, așa cum au arătat încă din 1940 cercetările lui Rowland și Besredka.

Totuși, endotoxina *P. pestis* prezintă unele particularități față de endotoxinele altor specii microbiene, diferind de acestea în primul rînd prin constituția chimică, fiind de natură proteică (Ramon, Girard, Richou, 1947).

Pentru prepararea toxinei pestoase s-au folosit fie filtrarea culturilor vechi, autolizate în bulion, fie diferite metode de extracție.

Girard (1950) a obținut produse de înaltă toxicitate prin filtrarea lizatelor obținute sub influența bacteriofagului.

Problema rezistenței la căldură a toxinei pestoase a dat naștere la cercetări numeroase. Petrie a arătat necesitatea păstrării extractelor toxice la o temperatură care să nu depășească + 3°. Asupra limitei superioare de rezistență, Meyer a obținut inactivarea în 4 ore la 65°, iar Gheltenkoff într-o oră la 65° sau 30 de minute la 80°.

Rozătoarele și, în mod deosebit șoarecii, sînt sensibile la acțiunea toxinei pestoase, administrarea subcutanat sau intraperitoneal, omorînd animalele în 18 ore. Cobaii și iepurii rezistă la doze mari de toxină.

Boala la om. În raport cu calea de pătrundere și localizarea germenului în organism, pesta poate îmbrăca diferite forme clinice; cele mai frecvent întîlnite sînt *pesta bubonică* și *pesta pulmonară*.

1. *Pesta bubonică* sau glandulară urmează pătrunderii germenului pe cale cutanată, fiind produsă în majoritatea cazurilor prin înțepătura puricilor de pe rozătoare infectate.

După o perioadă de incubație de 1—7 zile cu pustulă la locul de inoculare sau fără, boala se caracterizează prin fenomene de infecție generală, prinderea ganglionilor locali și regionali cu infiltrația hemoragică a țesutului ganglionar și periganglionar. Febra precede sau apare o dată cu bubonul. Bubonul este dureros la presiune și are tendință la supurație (a 8-a — a 15-a zi), prezentînd un puroi cremos și bogat în bacili pestoși.

Din sistemul limfatic germenul trece în sînge, producînd septicemii cu localizări în diferite organe (splină, ficat, plămîn, rinichi, piele, seroase, mucoase), boala prezentînd simptomatologia corespunzătoare organului afectat, la care se adaugă febră, stare generală rea, cefalee, dureri musculare. Formele grave se însoțesc de adinamie, obnubilare, tulburări psihice. Proporția mortalității în această formă se cifra la 60—80% din cazuri.

2. *Pesta pulmonară* este determinată de obicei prin infecția pe cale respiratorie (pulmonară, amigdaliană). De asemenea ea poate constitui o localizare secundară, dobîndită pe cale sanguină.

Perioada de incubație este scurtă în această formă, în medie 3 zile. Boala debutează brusc și alarmant, cu frison, febră, dispnee, tuse, fenomene generale; expectorație abundentă, muco-sero-sanguinolentă, foarte bogată în germeni, ceea ce asigură contagiozitatea extremă a acestei forme de pestă.

Mortalitatea era foarte ridicată, 98—100% din cazuri.

3. *Pesta septicemică* (cu bubon inaparent) se caracterizează prin debut brusc, cu frison, cefalee, febră 40°, dispnee toxică, tulburări psihice, mortalitate ridicată și rapidă.

În raport cu intensitatea fenomenelor, s-au descris pesta fulgerătoare, pesta ușoară ca și forme inaparente.

Leziuni anatomopatologice. În pesta bubonică, leziunea caracteristică o constituie bubonul, constînd dintr-un proces inflamator de intensități variate, la nivelul unuia sau mai multor ganglioni limfatici, însoțit de periadenită. Procesul poate merge de la inflamație simplă la infiltrație gelatinoasă, infarct hemoragic sau ramolisment, pînă la lichefiere sau necroză completă. Cînd mai mulți ganglioni sînt interesați, ei sînt prinși într-o masă comună cu țesuturile din jur, rezultînd tumefacții considerabile.

Localizările la nivelul organelor produc leziuni congestive și hemoragice, hipertrofia splinei, ficatului, alături de focare de degenerescență grasă sau de necroză la nivelul ficatului, rinchiului etc.

În pesta pulmonară, leziunile caracteristice sînt localizate mai ales la nivelul căilor respiratorii, pleurei și plămînului. Ele constau din leziuni congestive și hemoragice, din aderențe fibrinoase între foițele pleurale însoțite sau nu de un exsudat seros sau sanguinolent la nivelul plămînului, din focare pneumonice lobulare, din leziuni de alveolită sero-edematoasă exsudativă.

Boala la animale. În mod spontan pesta este înainte de toate o boală a rozătoarelor. Dintre acestea, ea e răspîndită mai ales printre șobolani, putînd fi întîlnită însă și la șoarece, precum și la rozătoare sălbatice (tarbaganii, spermofilii, cobaii sălbatici etc.). La aceste animale, pesta poate îmbrăca aceleași aspecte ca cele întîlnite la om: pesta bubonică, pesta pneumonică, pesta septicemică, alături de forme inaparente și de pestă „reziduală". În această din urmă formă, descrisă inițial ca pestă cronică, se observă leziuni cu tendință la încapsulare și fibrozare, la nivelul ganglionilor sau viscerelor, cu aderențe care interesează membranele seroase învecinate.

Infecția experimentală. Pesta poate fi reprodusă experimental la cobai, șobolani, șoareci albi, iepuri, maimuțe etc.

Cobaiul, foarte receptiv la pestă, poate fi infectat pe diferite căi: pe cale cutanată (prin frecarea pielii rase sau chiar a pielii intacte cu material infectant), prin inoculare subcutanat, intraperitoneal, nazal sau ocular. Inocularea pe cale subcutanată produce moartea animalului în 2—5 zile, cu necroză la locul inoculării, infiltrație hemoragică a ganglionilor și țesuturilor înconjurătoare, cu leziuni hiperemice, hemoragice și necrotice în organe.

Pe cale intraperitoneală se obține moartea animalului în 24—36 de ore cu septicemie, iar inocularea pe cale nazală, produce pneumonie pestoasă cu moarte în 48—72 de ore.

Șobolanul infectat pe cale subcutanată, moare în 2—8 zile cu leziuni asemănătoare celor descrise la cobai. Infectarea pe cale nazală sau intraconjunctivală produce moartea animalului în 3—4 zile. Administrarea pe cale orală dă rezultate inconstante.

Șoarecele alb reacționează în general în mod asemănător. S-au descris unele rase care prezintă însă rezistență față de infecția experimentală cu *P. pestis*.

Iepurii răspund mai slab și mai inconstant.

Maimuțele au arătat mari diferențe individuale de receptivitate, fiind nerecomandate pentru a fi folosite în cercetările de infecție experimentală.

Imunitate. Majoritatea animalelor, în afară de rozătoare și om, sînt rezistente față de pestă.

Păsările, în condiții obișnuite, sînt refractare față de infecția pestoasă. Chiar în rîndul rozătoarelor se observă grade de sensibilitate diferite. Pe de altă parte, diferiți factori de mediu extern, printre care influențele sezoniere, joacă un rol însemnat în determinarea diferențelor de receptivitate, chiar în interiorul aceleiași specii. Rezistența rozătoarelor sălbatice hibernante a fost deseori semnalată.

Nu s-a putut dovedi existența unei imunități naturale la om față de pesta transmisă prin vectori, iar în ce privește pesta pulmonară cazurile semnalate sînt foarte rare și fără importanță practică.

Imunitate postinfecțioasă există, după unii autori fiind durabilă, după alții, relativă și temporară, cu o durată de 6—8 luni (Meyer, 1947). Diferitele componente antigenice par responsabile de producerea imunității dobîndite, la diferite specii animale.

Substanța de înveliș intervine în imunitate prin cele două fracțiuni antigenice pe care le conține, stimulînd producția de aglutinine, precipitine și anticorpi protectori pentru șoarece, șobolan, maimuță.

Antigenul somatic are proprietăți imunizante mai puțin bine determinate, el părînd a avea oarecare rol în inducerea rezistenței la cobai. Reiese că proprietățile imunizante ale *P. pestis* diferă după tipul de gazdă (tip șoarece și tip cobai), mecanismul de producere a imunității fiind probabil diferit. La șoarece, șobolan și maimuță, rezistența specifică ar fi legată de antigenul de înveliș, care intervine totodată și în determinarea virulenței în timp ce la cobai ar fi legată de un factor somatic.

Activarea fagocitozei prin intermediul opsoninelor precum și alți factori încă necunoscuți, intervin în producerea imunității dobîndite.

Schütze, studiind imunizarea activă contra pestei, a arătat importanța imunologică a antigenelor de înveliș. Prepararea vaccinului recomandat inițial de Haffkine, prin cultivarea germenilor la 37° și inactivare 15 minute la 60—64° (asigurînd dezvoltarea și menajarea antigenelor de înveliș) a ridicat eficiența profilactică a vaccinului pentru om.

În ultimele decade, atenția cercetătorilor s-a îndreptat către prepararea de vaccinuri vii, folosind culturi atenuate, bogate în antigene de înveliș (Otten, 1914; Girard și Robic, 1942) și chiar către vaccinuri preparate din extracte, conținînd exclusiv aceste antigene.

Tratament specific. Se folosește serul imun antipestos în doze de 50—100 ml, zilnic, în asociație cu sulfamidoterapie și tratament cu antibiotice.

Streptomicina s-a dovedit eficace mai ales în pesta bubonică. Aureomicina este activă în doze mari.

Diagnosticul de laborator

Precizarea diagnosticului pestei prin metode de laborator are o importanță deosebită cu atît mai mult cu cît acest diagnostic este chemat să impună aplicarea de urgență a măsurilor de combatere.

Diagnosticul de laborator al pestei se bazează în primul rînd pe izolarea germenului din produse patologice—diagnostic bacteriologic, iar în al doilea rînd pe decelarea anticorpilor specifici în ser—diagnostic serologic.

Alegerea metodelor de diagnostic, ca și a produselor patologice de examinat diferă, după cum este vorba de diagnosticul pestei umane sau al pestei rozătoarelor.

Diagnosticul pestei umane

Diagnosticul bacteriologic. Printre produsele patologice din care poate fi izolată *P. pestis* sînt de reținut:

— conținutul veziculei sau pustulei apărute la locul înțepăturii puricelui;
— serozitatea extrasă din ganglionii atinși;
— puroiul bubonului deschis;
— sputa (în formele de pestă pulmonară);
— sîngele;
— fragmente de organe de la cadavru (ficat, splină, coastă, ganglioni limfatici, sînge din inimă, măduva oaselor etc.);
— purici sau alți ectoparaziți recoltați de pe om sau animale capturate.

Condiții de recoltare și transport. Produsele de cercetat trebuie recoltate în mod steril, în recipiente sterile și ermetic închise. Transportarea materialului la distanțe trebuie făcută în condiții de refrigerare și în recipiente parafinate. Pentru conservarea materialului pînă în momentul examinării, s-au preconizat diferite lichide conservante. Printre acestea, lichidul lui Broquet: soluție de glicerol 20%, conținînd 2% carbonat de calciu, sterilizată 10 minute la 100° păstrează germenul virulent în organe 13—19 zile; soluții saline ca: soluție de citrat de sodiu pentru prelevarea sîngelui pentru hemocultură sau soluție de clorură de sodiu 2 sau 3% etc.

Examenul serozității recoltate din pustule sau ganglioni și al puroiului bubonic.

Examinarea microscopică directă: se efectuează frotiuri care se fixează prin trecere prin flacără. Unii autori recomandă fixarea frotiurilor cu alcool etilic 95° 1—10 minute (Webster) sau cu amestec în părți egale de alcool și eter. Se procedează apoi la colorarea frotiurilor prin metoda Gram, *P. pestis* apărînd colorată bipolar, gram-negativ.

Izolarea și identificarea. Se însămînțează produsul în bulion-ulei de vaselină, pe geloză și geloză-sînge, cu incubare la 25—30° și 37°. În cazuri pozitive se obține în bulion aspectul caracteristic de stalactită, iar pe geloză colonii fine granulare cu margini închise. Prin însămînțare pe geloză conținînd 3% NaCl, se obțin forme de involuție, caracter diferențial față de *P. pseudotuberculosis*.

Se procedează la identificarea germenului pe baza caracterelor biochimice, serologice și de patogenitate. Studiul caracterelor fermentative asupra anumitor zaharuri permite diagnosticul diferențial față de alte specii de *Pasteurella*. Identificarea serologică se face prin reacții de aglutinare față de serul imun specific. Caracterele de patogenitate se cercetează prin inoculare la cobai (vezi capitolul Infecția experimentală).

Testul biologic se efectuează mai ales pe cobai, prin aplicarea materialului patologic pe cale transcutanată (prin tamponare cu ajutorul unui tampon îmbibat cu produsul de cercetat, pe o regiune cutanată, în prealabil rasă) sau prin inoculare pe cale subcutanată sau intraperitoneală. În raport cu calea de administrare, apar leziuni caracteristice, prinderea ganglionilor și generalizarea infecției cu leziuni în organe.

Inocularea la șobolanul alb permite diferențierea *P. pestis* de *P. pseudotuberculosis*.

Animalele inoculate trebuie menținute în borcane de sticlă, acoperite cu capace de sîrmă dublate cu tifon pentru a le feri de contactul cu insecte.

Examenul sputei comportă aceleași metode de cercetare.

Hemocultura. Sîngele recoltat aseptic se însămînțează în două balonașe cu bulion simplu sau bulion glucozat 1%, conținînd 2% bilă, unul incubat la 37°, altul la 25° cu treceri ulterioare pe geloză.

Identificarea germenilor se face prin aceleași procedee ca cele descrise mai sus.

Examenul fragmentelor de organe. Se taie fragmentele în mod steril și se triturează în ser fiziologic. Suspensiile obținute sînt însămînțate, tehnica ulterioară fiind aceeași.

Examenul ectoparaziților. Paraziții recoltați de la om sau animale sînt triturați în ser fiziologic. Suspensiile obținute sînt apoi inoculate la cobai, de obicei pe cale subcutanată, testul biologic dovedindu-se mai eficient decît examenul microscopic direct sau însămînțările în medii de cultură.

Diagnosticul serologic se face prin:

Reacția de fixare a complementului, folosește ca antigen, fie suspensii microbiene, fie extracte. Ea s-a dovedit utilă atît în diagnosticul bolii obișnuite, anticorpii fixatori apărînd după unii autori chiar de la a 5-a zi de boală (Moses), cît mai ales în forme dubioase clinic și la convalescenți, reacția avînd și valoare retrospectivă.

Reacția de aglutinare. Aglutininele apar la titruri scăzute, fiind în genere decelabile după a 7-a zi de boală. Pentru diagnosticul retrospectiv al pestei umane, valoarea seroaglutinării a fost confirmată de numeroși cercetători. Anticorpii aglutinanți persistă 9—10 luni după trecerea prin boală, titrul lor nefiind modificat prin tratamentul chimioterapic.

Diagnosticul pestei rozătoarelor

Diagnosticul bacteriologic. Produsele patologice de examinat sînt fragmente de organe recoltate de la cadavre prin autopsie. O atenție deosebită trebuie dată deparazitării animalelor înainte de transportarea și autopsierea lor. Recoltarea puricilor de pe șobolani se face prin pieptănarea și perierea blănii în bazine cu apă. Transportul șobolanilor morți trebuie făcut în cutii metalice ermetic închise.

Recoltarea fragmentelor de organe trebuie făcută cu toate precauțiunile de sterilitate, folosind instrumente și recipiente sterile, ermetic închise.

Pentru izolarea *P. pestis* de la animale intrate în putrefacție, se recomandă examinarea măduvei oaselor, recoltată de la nivelul tibiei sau femurului. Fragmentele recoltate sînt examinate prin aceleași metode ca cele descrise la diagnosticul bacteriologic al pestei umane (examen microscopic, izolarea și identificarea germenilor și teste biologice).

Diagnosticul serologic. Se folosește mai ales testul de precipitare, care se efectuează cu ajutorul extractelor de organe, obținute prin fierberea fragmentelor de organ timp de un minut, urmată de filtrarea produsului.

Punînd în contact extracte de organe provenind de la animale pestoase, cu ser imun specific, se obține o reacție de precipitare.

Epidemiologie

Repartiția actuală a pestei. Pollitzer, în monografia sa asupra pestei (1954), arată localizarea focarelor mai recente de pestă, apărute pînă în 1952, în unele părți ale Asiei (China, Birmania, Tailanda, Java, India, Asia de sud-vest, Havai), în Africa de nord și nord-vest (Egipt, Tunis, Algeria), Africa de sud (Uniunea Sud-Africană), America de Nord (Canada), America de Sud (Venezuela, Brazilia, Argentina, Bolivia, Peru, Ecuador).

În Europa au fost semnalate ultimele epidemii efemere de pestă în Corsica și Italia în 1945, iar în Insulele Azore cazuri sporadice pînă în 1949.

Izvorul de infecție este reprezentat prin:

1. Omul bolnav, care elimină germenii prin spută (pesta pulmonară), puroiul bubonic, sînge, urină, materii fecale.

2. Șobolanii cu forme acute sau latente de boală, șoarecii și diferite rozătoare sălbatice.

„Pesta silvatică” constituie un vast rezervor de virus, reprezentat prin numeroase specii animale, diferite după regiune (de exemplu: în Asia de nord, tarbaganul; în Europa orientală, spermofilul; în America de Sud, cobaiul sălbatic). Pesta silvatică menține endemia pestoasă, constituind o sursă de infecție pentru șobolanul domestic.

Baltazard și colaboratorii iranieni au demonstrat rolul jucat de speciile de rozătoare foarte rezistente la infecția pestoasă, de exemplu *Meriones persicus* și *Meriones libycus*, în menținerea endemiei pestoase.

Printre speciile de şobolani, mai frecvent atinşi sînt şobolanul de cîmp (*Mus decumanus*) şi şobolanul de casă (*Mus rattus*). Epidemiile de pestă umană au fost de obicei precedate de epizootii la rozătoare.

Modul de transmitere. Transmiterea de la şobolan la şobolan se face numai prin intermediul puricilor de şobolan (*Xenopsylla cheopis* şi *Ceratophyllus fasciatus*).

În ce priveşte transmisiunea bolii la om, calea directă de infectare prin excrete, puroi bubonic etc. este rară în formele de pestă bubonică, care rămîne prin excelenţă transmisă prin înţepătura puricelui de şobolan.

O serie de autori au raportat transmisia infecţiei şi prin ectoparaziţii omului, *Pulex iritans* mai ales, care ar asigura vecţiunea interumană, omul bolnav fiind foarte contagios în perioada septicemică. Germenii se înmulţesc în stomacul insectei, fiind eliminaţi din tubul digestiv prin materiile fecale, care infectează plaga produsă prin înţepătură. Alteori, puricele elimină germenii prin regurgitaţie.

Puricii rămîn infectanţi luni de zile. Pe de altă parte, Kato a demonstrat că contagiozitatea dejecţiilor de purice se menţine cel puţin 8 zile.

Contagiul direct are o importanţă deosebită în pesta pulmonară, unde infectarea pe cale respiratorie cu picături de spută încărcată cu germeni, emise în timpul acceselor de tuse, a fost frecvent semnalată.

Măsuri de profilaxie şi combatere. Împotriva sursei de infecţie reprezentată prin omul bolnav şi şobolani, se acţionează în primul rînd prin depistarea precoce şi izolarea bolnavilor, prin dezinfecţie, dezinsecţie şi deratizare. La acestea se adaugă seroprofilaxia specifică şi chimioprofilaxia contacţilor, cu carantinarea lor timp de 6—10 zile.

Cadavrele trebuie arse sau înhumate la mare adîncime.

În zonele cu endemicitate permanentă trebuie urmărită periodic depistarea cazurilor de pestă la rozătoare. Măsurile de deratizare a vapoarelor şi celorlalte mijloace de transport care asigură legătura cu asemenea zone endemice nu trebuie neglijate.

Profilaxia specifică cu vaccin antipestos a călătorilor care vin sau pleacă din regiuni cu endemie de pestă, precum şi carantinarea timp de 6—10 zile a contacţilor care părăsesc zonele cu focare de boală sînt obligatorii.

Pasteurella pseudotuberculosis

Face parte tot din genul *Pasteurella*, familia *Brucellaceae*.

Observat prima dată de către Malassez şi Vignal în 1883, a fost denumit de Pfeiffer în 1889 *B. pseudotuberculosis* sinonim *Streptobacillus pseudotuberculosis rodentium*.

Specie larg răspîndită în natură, fiind găsită în sol, apă, alimente etc.; este parazit al rozătoarelor şi în special al cobailor.

De formă cocobacilară, cu capete rotunjite, se poate prezenta uneori ca bastonaşe lungi. Este dispus izolat, în grupuri sau lanţuri scurte, chiar filamentoase. Este mobil, cînd este cultivat la 22°, imobil la 37°. Gram-negativ, nu este acidorezistent, neîncapsulat, nesporulat. Cultivat în bulion, tulbură moderat mediul, cu depozit vîscos.

Pe geloză, dezvoltă după 24 de ore la 37° colonii de 0,5—1 mm diametru, translucide, cenuşii-gălbui, cu suprafaţă granulară şi margini neregulate, de consistenţă untoasă.

Pe mediul cu cartof, produce după 7 zile la 22° o cultură gălbuie care mai tîrziu devine brună.

Aerob şi facultativ anaerob, se dezvoltă în condiţii optime la 30°.

Produce H_2S, nu formează indol, alcalinizează laptele, reacţia roşu de metil este pozitivă, Voges-Proskauer negativă. Este lipsit de acţiune proteolitică şi hemolitică, descompune ureea. Fermentează glucoza, maltoza, manita, salicina, ramnoza, glicerolul etc.

În structura antigenică a *P. pseudotuberculosis* s-a descris un antigen flagelar termolabil, format numai în culturi dezvoltate sub 25° şi antigene somatice termostabile, printre care unul comun cu al *P. pestis* şi altul comun cu o fracţie antigenică a *S. paratyphi B*.

Agent cauzal al pseudotuberculozei la rozătoare şi mai ales la cobai (şobolanul alb este rezistent), precum şi la alte animale ca iepure, cal, vite, cîine şi pisică, sau păsări (găină, curcan etc.).

Pseudotuberculoza la om este foarte rar semnalată, putînd manifesta o formă intestinală sau pulmonară.

Inoculată experimental la cobai, pe cale subcutanată, produce moartea animalului în 1—3 săptămîni, cu leziuni cazeoase la locul de inoculare, adenopatie regională, noduli în splină, ficat şi plămîn.

Redăm în tabelul LXI unele caractere diferenţiale în grupul *Pasteurella* (după Wilson şi Miles, 1957), în vederea stabilirii diagnosticului diferenţial.

Tabelul LXI

	P. pestis	*P. pseudotuberculosis*	*P. septica*
Mobilitatea culturii în bulion la 22°	—	+	—
Mediul cu lapte	— sau uşor acid	alcalin	—
Caractere fermentative:			
— glucoză	+	+	+
— maltoză	+	+	uneori
— manită	+	+	+
— salicină	+	+	+
— zaharoză	—	uneori	+
Indol	—	—	+
Roşu de metil	+	+	—
Reducerea albastrului de metilen	—	+	+
Dezvoltare în mediul Mac Conkey	+	+	—
Patogenitate pentru şobolanul alb	+	—	+

Pasteurella tularensis şi tularemia

Prof. ALEXANDRINA GAIGINSCHI

Pasteurella tularensis. Sinonime: *Bacterium tularense* (McCoy şi Chapin), *Brucella tularensis* (Topley şi Wilson), izolat în anul 1912 de McCoy şi Chapin, este agentul etiologic al tularemiei, boală spontană a rozătoarelor sălbatice, care poate să fie transmisă omului direct sau prin insecte vectoare.

Germenul a fost izolat în California de la specia *Citellus berchey* într-o epizootie a rozătoarelor.

În ce priveşte poziţia acestui germen în sistematica microbiană sînt încă divergenţe, deoarece prin unele caractere este asemănătoare germenilor din genul *Brucella*, iar prin altele celor din genul *Pasteurella*.

Pasteurella tularensis, aşa după cum s-a arătat, este inclusă actualmente în genul *Pasteurella*, familia *Brucellaceae*.

Istoric. Încă înainte de descoperirea agentului patogen, se citează epidemii de tularemie pe teritoriul Europei, S.U.A şi Japoniei. Date mai sigure despre prezenţa tularemiei în Europa spre sfîrşitul secolului trecut sînt acelea referitoare la cazurile de conjunctivită descrise în 1899 de către Pariceaud în Franţa. Istoricul tularemiei începe însă în 1911, cînd Mc Coy şi Chapin descriu în California o epizootie a rozătoarelor pe care reuşesc să o transmită la cobai. Aceşti autori dau primele informaţii cu privire la patogenitatea germenului şi realizează pentru prima oară diagnosticul serologic la om.

Din 1919, Francis întreprinde o serie de cercetări prin care stabileşte principalele date epidemiologice ale bolii şi dovedeşte rolul vector al unor insecte în transmiterea bolii.

In 1925, Ohara descrie în Japonia o boală asemănătoare, izolează germenul, care ulterior s-a dovedit identic cu acel izolat de McCoy şi Chapin în S.U.A. Boala era cunoscută în Japonia din 1877 şi în lumina cunoştinţelor actuale a fost încadrată ca tularemie. În 1926, Suvorov, Voronkova şi Volfertz descriu o epidemie de tularemie determinată de contactul cu şobolanii de apă infectaţi. Ulterior s-au descris alte epidemii din care Zarbi izolează agentul patogen, identic cu *Pasteurella tularensis*. Autorii sovietici aduc contribuții deosebit de importante în ce privește studiul patogenic, epidemic și tratamentul specific al tularemiei.

La noi în țară, Stănculeanu publică în anul 1908 un caz de conjunctivită Pariceaud, iar în 1945 sînt semnalate în regiunea Iași cazuri suspecte de tularemie, în care diagnosticul clinic și de laborator a fost făcut pentru prima dată de Nicolau și Condrea.

Studiile epidemiologice, clinice și bacteriologice din țara noastră au adus contribuții prețioase în acest domeniu.

Habitat. *Pasteurella tularensis* se găsește în apă, în organismul animalelor infectate și al unor insecte hematofage. În stare naturală pot fi infectate numeroase rozătoare sălbatice, care prezintă o boală pestiformă precum și unele păsări.

Caractere morfologice și tinctoriale. *Pasteurella tularensis* este un germen polimorf, de dimensiuni foarte mici, cuprinse între 0,2 și 0,7 μ; pentru unele elemente microbiene, dimensiunile sînt și mai mici, de 300—350 mμ, ceea ce face posibilă filtrabilitatea lor prin gradocol.

În culturi, *P. tularensis* prezintă polimorfism accentuat, apărînd sub formă de coci sau mici bacili. În culturile tinere se găsesc mai frecvent formele bacilare, iar în culturi mai vechi forme cocoide. Pe medii puțin favorabile apar forme alungite sau filamentoase. Germenul este imobil (aciliat) și fără spori. Prezintă capsulă vizibilă în frotiurile din organe sau în culturi pe medii lichide. Celulele bacteriene sînt de obicei izolate, uneori grupate în mici grămezi.

Este gram-negativ; se colorează electiv prin metoda Giemsa, cu fucsină fenicată sau violet de gențiană.

Caractere de cultură. Pentru dezvoltare, *Pasteurella tularensis* necesită medii speciale, în compoziția cărora trebuie să se găsească gălbenuș de ou, cistină, sînge și glucoză; nu cultivă pe medii uzuale. Se dezvoltă în condiții aerobe, la temperatura optimă de 37°, limitele fiind cuprinse între 20° și 37°.

În medii lichide, cultivarea este lentă, producînd un văl fin la suprafață.

Pe mediul McCoy care conține gălbenuș de ou 60% și ser fiziologic 40% (mediul este coagulat prin căldură), cultivă în 24—48 de ore, sub formă de colonii mici, granulate, rotunde transparente. Mediul McCoy modificat de Condrea (gălbenuș de ou și digestie de carne, ficat și cheag de sînge) este superior.

Un alt mediu favorabil este mediul Francis, compus din geloză 2% cu adaos de glucoză 0,1%, cistină 0,1% sau clorhidrat de cisteină și sînge defibrinat de iepure 3—5%, pe care *Pasteurella tularensis* se dezvoltă sub formă de colonii relativ mari, rotunde, lactescente, mucoase, cu tendință la confluență.

Un mediu superior mediului Francis a fost preparat de Condrea, bulionul fiind înlocuit cu un extract de digestie peptică la care se adaugă agar-agar și, în momentul întrebuințării, glucoză; mediul nu conține cistină.

Un alt mediu este preparat de Cornelson și colaboratorii, în care cistina este înlocuită printr-un hidrolizat de copită.

Germenul se dezvoltă cu ușurință pe medii care conțin hidrolizat de cazeină, cistină, extract globular sau extract de ficat.

Pasteurella tularensis se dezvoltă pe membrana corioalantoidă a oului embrionat; embrionul moare în 3—4 zile.

Caractere biochimice şi de metabolism. Este un germen aerob şi anaerob facultativ; are o acţiune biochimică foarte redusă; fermentează glucoza, maltoza, manoza, levuloza, glicerolul, cu producerea slabă de acid şi fără formare de gaze. În mediul cu cistină produce H_2S. Nu produce hemolizine.

Rezistenţa la agenţii fizici, chimici şi biologici. Rezistenţa P. *tularensis*, în diferite condiţii care se pot întîlni în natură, prezintă o deosebită importanţă pentru epidemiologia şi profilaxia tularemiei. S-a constatat că germenul îşi păstrează vitalitatea şi virulenţa în grăunţele de graminee peste 100 de zile; în lapte 8 zile; în pîine 14 zile; în apa de rîu şi în mîl se conservă timp de 3—7 luni. În cadavrele şobolanilor de apă, *Pasteurella tularensis* se menţine 8—10 zile; organele animalelor infectate, conservate la rece în glicerină, păstrează capacitatea infectantă pînă la un an.

În culturi pe medii cu ou, viabilitatea este conservată timp de o lună la temperatura laboratorului şi cîteva luni — un an, la gheaţă. Liofilizarea este folosită în prezent pentru conservarea tulpinilor. Lumina, razele ultraviolete, ultrasunetele au influenţă diferită, în raport cu durata şi intensitatea lor, pînă la distrugerea germenului. Este omorît în 10 minute la 55—60°, de asemenea este sensibil la uscăciune. Este sensibil la acţiunea antisepticelor şi antibioticelor: streptomicină, aureomicină, teramicină.

Structura antigenică. *Pasteurella tularensis* are o structură antigenică omogenă; pînă în prezent nu au fost diferenţiate mai multe tipuri serologice; germenii izolaţi din diferite regiuni şi surse de infecţie sînt aglutinaţi de serul antitularemic la acelaşi titru.

Pe de altă parte, *P. tularensis* este aglutinat de serurile anti-*brucella*, deşi germenul nu este capabil să adsoarbă aglutininele din aceste seruri. *Br. abortus* şi *melitensis* pot fi aglutinate de serul aglutinant antitularemic, fără de asemenea, ca aceşti germeni să adsoarbă aglutininele din serul antitularemic. Această înrudire antigenică a îngăduit introducerea în familia *Brucellaceae* a *P. tularensis*.

Din punct de vedere chimic Bernhof şi Hatenever au pus în evidenţă un complex glucido-lipido-polipeptidic extras cu acid tricloracetic, care după Girard şi Gallut nu este toxic. Veroninova şi Kontonina au izolat o fracţiune polipeptidică care se comportă ca haptenă şi care provoacă reacţii alergice la persoane bolnave de tularemie.

Variante. În anumite condiţii de mediu se pot obţine variante de *Pasteurella tularensis*, printre care variaţiile de virulenţă prezintă o importanţă practică deosebită pentru imunizarea antitularemică cu vaccinuri vii.

Administrarea de 2,5 mg cortizon, patru ore după infecţia şoarecelui cu o tulpină de *P. tularensis*, poate să ducă la moartea animalului dacă tulpina injectată este atenuată. Dacă tulpina este complet avirulentă moartea animalului nu survine (Skrodzki).

Se pare că tulpinile de *P. tularensis* cele mai virulente sînt în America de Nord (varianta *Francisella tularensis tularensis*); cele din Europa (varianta *F. tularensis palеartica*) sînt mai puţin virulente. Păstrarea îndelungată a culturilor pe medii artificiale, ca şi folosirea metodelor dirijate (tratarea cu ser imun şi menţinerea la termostat pe medii cu bilă) permite obținerea variantelor cu virulență atenuată. În culturi pe mediul Francis cu penicilină și ser de cal, se semnalează apariția unor aspecte ale ciclului „L" (Beurey, Lavergne).

Caractere de patogenitate. Datele autorilor sînt contradictorii în ce privește existența unei endo- sau exotoxine la *Pasteurella tularensis*. Filtratele culturilor nu s-au dovedit toxice pentru șoarece. Culturile totale omorîte prin agenți fizici sau chimici, inoculate la omul și animalul normal, nu provoacă reacții locale sau generale.

Germenul are însă o mare capacitate de invazie și contagiozitate, infecția avînd loc și prin tegumentele intacte.

Boala la om și la animale. Tularemia este o boală infecțioasă epidemică, descrisă pentru prima oară în regiunea orașului Tulare din America de Nord. Extinderea bolii s-a realizat prin importul pieilor de animale bolnave (îndeosebi rozătoare) care constituie izvoare naturale de boală.

Printre animale, boala se transmite prin insecte: căpușe, tăuni, ploșnițe, purici etc.

Transmiterea infecției se poate face direct de la animale la om prin contactul cu blănurile sau carnea animalelor bolnave, indirect prin apa sau alimentele infectate și mai rar prin înțepături de insecte.

Mc. Crumb (1961) a dovedit că tularemia se poate contracta destul de des pe cale respiratorie determinînd „tularemia tifoida". Sînt suficienți numai 25 de germeni pentru a infecta omul prin acest mijloc (infecție prin aerosoli).

Dată fiind contagiozitatea și marea capacitate de invazie a germenului au fost posibile și contaminări de laborator, îndeosebi prin manipularea animalelor infectate. După o infecție de contact prin piele sau mucoase, sau după înțepătura unei insecte, germenii pătrund prin căile limfatice în ganglionii limfatici regionali, formîndu-se astfel bubonul tularemic cu diferite localizări: axilar, inghinal, submaxilar etc. Ulterior, ganglionii supurează și fistulizează.

După o incubație medie de 3 zile, care poate varia însă între 14 ore și 10 zile, boala se manifestă prin febră ridicată, astenie, ulcerații cu localizări diverse, cutanate și conjunctivale, adenopatii voluminoase. Boala durează de la cîteva săptămîni la cîteva luni și îmbracă cele mai variate forme: 1) tularemia ganglionară cu formele ganglionară pură, ulcero-ganglionară, angio-ganglionară și oculo-ganglionară; 2) tularemia viscerală; 3) forme inaparente de boală. Forma ganglionară pură este identică cu aceea ulceroasă-ganglionară, la care lipsesc însă unele leziuni inițiale.

Forma ulceroasă-ganglionară se manifestă printr-o pustulă, urmată la locul de pătrundere a germenilor, de ulcerație și adenopatie voluminoasă regională, care supurează.

Forma anginoasă-ganglionară se traduce prin inflamația vălului sau angină flegmonoasă însoțită de inflamația ganglionilor aferenți. Tularemia viscerală îmbracă o formă tifică manifestată prin febră și astenie care se pretează la confuzia cu febra tifoidă și gripa și o formă pulmonară cu localizări în plămîn și pleură. În tularemie, prognosticul este în general benign; letalitatea semnalată pînă în prezent este de aproximativ 5%; convalescența este de obicei lungă și însoțită de astenie.

Specii animale variate, îndeosebi rozătoare, se pot infecta în condiții naturale cu *Pasteurella tularensis*; dintre rozătoare sînt mai frecvent afectați șoarecii de cîmp (*Microtus arvalis*), șobolanii de apă (*Arvicola amphibius*) și șoarecele de casă (*Musmusculus*), hamsterul și iepurele.

Printre animalele domestice, tularemia se întîlnește cel mai frecvent la oaie, apoi la cîine, bovine și porcine.

Infecția experimentală. Dintre animalele de laborator, cele mai sensibile la infecția tularemică sînt șoarecii, cobaii și iepurii, care pot fi inoculați pe orice cale, chiar prin simpla frecare a pielei rase, cu o cultură sau cu un produs patologic care conține germenii. Șoarecele infectat moare în 3—6 zile, în urma unei septicemii masive; la autopsie se constată ganglionii regionali hipertrofiați și congestionați, splina și ficatul mărite de volum, pe suprafața lor observîndu-se noduli foarte mici care pot fi văzuți cu lupa. La examenul microscopic se pot observa în ficat focare hemoragice, celulele avînd aspectul unor pungi pline cu germeni. În frotiuri din organe (splină, ficat) sau din sînge, germenii se găsesc în mare cantitate și pot fi puși în evidență prin orice metodă de colorație.

Cobaiul moare în 6—10 zile, la autopsie constatîndu-se splina și ficatul hipertrofiate, cu numeroși noduli necrotici vizibili cu ochiul liber.

La iepure, tularemia se manifestă ca o infecție febrilă, însoțită de astenie, cu moartea animalului în cîteva zile sau cîteva săptămîni, în funcție de virulența germenului; la autopsie se constată hipertrofie ganglionară, hipertrofia splinei și a ficatului, și numeroși noduli în splină și ficat, mai rari în plămîn.

Imunitate. După infecția tularemică, imunitatea este durabilă; se poate conferi și imunitatea artificială activă prin administrarea de vaccin.

Tratament specific. Seroterapia cu ser de convalescent sau cu ser imun, preparat pe animale, nu a dat rezultate satisfăcătoare; vaccinoterapia cu vaccinuri preparate din germeni omorîți prin procedee fizice sau chimice nu este eficace; cele mai active sînt vaccinurile cu germeni vii, preparate din tulpini de *Pasteurella tularensis* cu virulența atenuată sau complet avirulente.

Vaccinarea cu vaccin viu aplicată în primele zile de boală, scurtează în mod simțitor evoluția acesteia; chiar aplicată mai tîrziu s-a dovedit eficientă.

Vaccinoterapia a fost aplicată pe o scară largă de autorii sovietici Gaiski, Elbert și, în Romînia, de Condrea și colaboratorii (1954).

Diagnosticul de laborator

Diagnosticul se efectuează prin *metode directe*, bacteriologice, care au de scop să pună în evidență agentul etiologic în produsele patologice și prin *metode indirecte*, care constau în examene serologice și reacții alergice cutanate. În boala umană, agentul patogen nu poate fi pus în evidență în produsele patologice prin examen direct microscopic, iar cultivarea reușește cu greu.

Faptul că în exsudatul ganglionar nu se pune în evidență agentul microbian, este folosit drept criteriu de diferențiere față de pesta bubonică benignă, în care examenul secreției ganglionare dă rezultate pozitive prin microscopie directă și însămînțări. Pentru izolarea germenilor de la bolnav, se recurge la proba biologică de inoculare a produsului patologic la animalele sensibile de laborator, îndeosebi la şoarecele alb. În acest caz se va inocula pe cale peritoneală sau subcutanată secreţia ganglionară extrasă în perioada de congestie; puroiul extras din ganglionii supuraţi nu dă rezultate.

Hemocultura se practică în perioada acută a bolii, în plină febră, inoculînd sîngele bolnavului pe cale peritoneală la cobai sau la şoarece, deoarece însămînţarea pe medii selective nu dă întotdeauna rezultate.

Rezultate pozitive se pot obţine şi în urma inoculării produsului din ulceraţiile cutanate sau amigdaliene şi din ulceraţiile conjunctivale în cazurile de formă oculo-ganglionară.

Şoarecele inoculat moare în 3—6 zile, cu leziunile macroscopice şi microscopice descrise anterior; bacterioscopia organelor şi a sîngelui va pune în evidenţă prezenţa germenilor în mare număr. Sîngele extras din inima animalului va fi însămînţat pe medii elective, obţinînd în acest fel cultivarea *P. tularensis*. Identificarea germenului izolat se va face pe baza cercetărilor morfologice, tinctoriale şi de cultură şi prin aglutinarea cu seruri imune specifice.

Diagnosticul indirect comportă metode serologice şi cercetarea stării alergice.

Începînd din a doua săptămînă de boală, în sîngele bolnavilor de tularemie, apar anticorpi aglutinanţi care reacţionează specific cu *P. tularensis*. Titrul aglutininelor creşte pînă în a cincea săptămînă de boală, rămîne apoi o perioadă de timp staţionar, după care scade, persistînd totuşi 10—20 de ani, ceea ce îngăduie posibilitatea unui diagnostic retrospectiv.

Antigenul utilizat pentru efectuarea reacţiei de aglutinare se prepară din culturi de *P. tularensis* în vîrstă de 2—3 zile, suspensionate în ser fiziologic formolat 2% (suspensia conţine un miliard germeni pe ml). Citirea reacţiei se face după o incubaţie de 2 ore la 37° şi 24 de ore la gheţar. Aglutinarea este de tip „O", somatică, vizibilă cu ochiul liber. Se consideră aglutinarea pozitivă, indicînd infecţia tularemică de la titrul 1/80 şi mai ales dacă titrul creşte în timpul bolii. Titrurile maxime constatate variază de la 1/1 500—1/10 000; aglutininele sînt prezente şi la vaccinaţii contra tularemiei. Este de recomandat să se efectueze cu serul bolnavului şi reacţii de aglutinare faţă de *Brucella abortus* şi *S. typhi* şi *S. paratyphi* A şi B, deoarece serul bolnavilor de tularemie poate aglutina şi alţi germeni, însă la titruri joase.

În acelaşi scop se poate practica şi reacţia de aglutinare pe lamă. Pentru aceasta se utilizează o picătură de sînge umed sau uscat care se amestecă pe o lamă cu o picătură de antigen tularemic (5 miliarde germeni pe ml). Citirea reacţiei se face după 1—2 minute. Pentru precizarea diagnosticului la cadavrele animalelor moarte în urma infecţiei tularemice, se practică reacţia de precipitare inelară, utilizînd ca antigen un extras de organe (după metoda Ascoli) care este pus în prezenţa unui ser precipitant antitularemic.

Reacţia opsono-citofagică, după tehnica Huddleson-Kaimaţova, constituie un mijloc preţios de diagnostic către a 8-a zi de boală, după 30 de zile această reacţie oferind indicaţii de imunitate.

Diagnosticul prin intradermoreacţie. Bolnavii cu tularemie capătă în scurt timp de la începutul bolii (3—4 zile) o sensibilizare alergică față de antigenul tularemic; reacția este specifică și durabilă (rămîne pozitivă după mulți ani de boală), ceea ce permite diagnosticul atît în cursul bolii, cît și retrospectiv.

Testul de alergie cutanată se practică inoculînd intradermic, în regiunea mijlocie a feței anterioare a antebrațului, 0,1 ml tularină; tularina reprezintă o suspensie de *P. tularensis*, omorîtă prin căldură la 80° sau prin diferite substanțe chimice. Reacția apare în primele 24 de ore, devine caracteristică după 48 de ore și constă într-o papulă infiltrată, înconjurată de un edem congestiv, care persistă 5—15 zile, lăsînd o zonă pigmentată, persistentă. Reacția se consideră pozitivă, dacă are diametrul de cel puțin 1 cm și dacă persistă cel puțin 48 de ore. Reacția la tularină este pozitivă la bolnavii de tularemie, la foștii bolnavi (cu peste 20 de ani înainte) și la vaccinații antitularemic.

Sensibilizarea la antigenul tularemic fiind foarte precoce și foarte persistentă, această reacție prezintă avantajul că poate fi utilizată pentru diagnostic în masă (în teren), în focarele epidemice, sau atunci cînd trebuie stabilit, dacă într-o anumită regiune a existat sau nu un focar de infecție tularemică.

Epidemiologie

Tularemia este o boală cu focalitate naturală. Principalele rezervoare de virus sînt reprezentate de rozătoarele bolnave. Boala se transmite de la un animal la altul și de la o specie la alta. Importante sînt îndeosebi acele specii de rozătoare care vin în contact mai strîns cu omul, infecția umană avînd caracter accidental. Insectele hematofage și în special căpușele au o deosebită importanță ca vectori.

Tularemia poate fi transmisă omului în diferite împrejurări: prin contact direct cu animalele bolnave sau cadavrele acestora, prin contact indirect cu obiectele, apa, alimentele contaminate de animalele bolnave, prin praf și prin înțepăturile insectelor hematofage (căpușe, țînțari, tăuni, ploșnițe).

În funcție de natura sursei de infecție și de mecanismul de transmitere, epidemiile de tularemie prezintă caractere particulare; epidemiile de tip profesional apar de cele mai multe ori legate de vînătoarea rozătoarelor pentru blana sau carnea lor; unele epidemii de tularemie sînt legate de epizootiile printre șoareci, îndeosebi specii de șoareci de cîmp și de casă. Se descriu epidemii de transmitere prin insecte hematofage, care pot fi foarte întinse; Condrea, Cornelson și colaboratorii au izolat *Pasteurella tularensis* de la căpușa *Dermacentor marginatus*. Rolul apei ca sursă de infecție în tularemie a fost semnalat de autorii sovietici (Somov, Karpov, Antonov, Taraeva).

Trebuie menționate și contaminările accidentale de laborator, atunci cînd se manipulează animalele infectate. Nu se citează contaminări interumane.

Actinobacillus mallei şi infecţia morvoasă

Dr. Marcella Popovici

Actinobacillus mallei este agentul cauzal al morvei, boală care afectează solipedele domestice (cal, măgar, catîr), dar care poate trece la om, producînd o boală altădată mortală.

Clasificare. Bacilul morvei face parte din familia *Brucellaceae*, genul *Actinobacillus*. Desemnat în nomenclatura actuală ca *Actinobacillus mallei*, este cunoscut încă sub numele de *B. mallei*, *Pfeifferella mallei* sau *Malleomyces mallei*.

Istoric. Izolarea agentului cauzal al morvei s-a făcut în 1882, simultan de către Loeffler şi Schütz în Germania, şi de către Bouchard, Capitan şi Charrin în Franţa.

Un an mai tîrziu (1883), Vasiliev dovedea etiologia comună a bolii la om şi animale.

O altă dată importantă în istoricul morvei o constituie descoperirea maleinei, de către savanţii ruşi Helman şi Kalning, în 1891. Ulterior cercetări numeroase (Roux şi Nocard, Kitt şi Foth, Babeş, Riegler şi A. Ciucă) au precizat caracteristicile şi modul de folosire a maleinei.

În materie de profilaxie şi terapie a morvei trebuie reamintite cercetările lui Munţiu, care încă din 1943 a pus în evidenţă acţiunea favorabilă a sulfatiazolului.

Habitat. Germen strict parazit, se găseşte la solipede şi om.

Caractere morfologice. Cu formă de bastonaş de 2–5 μ lungime şi 0,4–0,7 μ grosime, prezintă un polimorfism accentuat. În produse patologice apare ca bastonaşe fine, uşor curbate. În culturi tinere prezintă capete rotunde, cu margini neregulat paralele. Germenii sînt aşezaţi izolaţi, în diplo, cap la cap, paralel sau cu aspect de litere chinezeşti.

În culturi vechi se remarcă un polimorfism accentuat, cu forme lungi, filamentoase, arborescente, neregulate.

Colorabilitate. Prezintă afinitate moderată pentru coloranţii de anilină, albastru de toluidină, tionină fenicată. Este gram-negativ, neacidorezistent. Se colorează inegal, cu aspect granular, cu zone alternativ colorate şi necolorate, iar alteori doar cu capete colorate. Această inegalitate a fost atribuită granulelor lipidice prezente în citoplasmă, care nu se colorează cu coloranți de anilină, dar se colorează cu Sudan.

Este imobil, necapsulat, nesporulat.

Caractere de cultură. Crește greu la izolarea din organism. Se adaptează apoi în treceri succesive. Sub 20° nu crește, sau crește foarte slab. În bulion prezintă o creștere moderată, în 48 de ore la 37°, tulbură uniform cu depozit pulverulent. După incubare prelungită de 14 zile face văl, cu inel aderent la pereți și depozit vîscos greu dezintegrabil.

Pe *geloză* 2%, după 48 de ore de incubare la 37°, dezvoltă colonii mici, de 0,5–1 mm diametru, rotunde, convexe, translucide, de culoare galben-verzui, cu suprafață netedă și margini regulate. Ele au o consistență untoasă și sînt ușor suspensionabile. După cîteva zile, coloniile cresc la 1–2 mm diametru, devin mai opace și cu suprafața fin granulară, uneori cu centrul brun.

Pe *mediul cu cartof*, *Ac. mallei* oferă aspectul cel mai caracteristic. După incubare de 48 de ore la 37°, cultura este umedă, lucioasă, ușor pigmentată galben-verzui. După 4 zile, culoarea culturii se închide, coloniile fiind asemănătoare cu culoarea cafelei cu lapte, devenind ulterior (10 zile) brună-șocolatie.

Pe *gelatină*, însămînțat în suprafață și incubat la 20°, dezvoltă colonii mici, punctiforme, alburii, de aspect mucos. Cu timpul (6 săptămîni) cultura se pigmentează, devenind brună.

Pe *geloză-sînge de cal* dezvoltă, după incubare de 3 zile la 37°, colonii rotunde, 1 mm diametru, plate, opace, pigmentate în galben-verzui, nehemolitice.

Pe *ser coagulat* dezvoltă colonii discrete, abia vizibile.

Pe *agar MacConkey* nu crește nici în 9 zile.

În culturi vechi și pe medii conținînd doze subbacteriostatice de sulfatiazol, germenii se dizociază în forme „S" virulente și în forme „R", puțin virulente (Munțiu și colaboratorii, 1952).

Caractere biochimice și de metabolism. Germen aerob, se dezvoltă în limitele de temperatură între 20 și 43°, avînd ca temperatură optimă 37–38°. Sub 20° nu crește sau crește foarte slab ; pH optim este în jurul neutralității.

Adăugarea de glicerină la mediile de cultură accelerează creșterea germenilor.

Are o acțiune fermentativă redusă — atacă glucoza și foarte rar și slab salicina — nu are proprietăți proteolitice.

Lipsit de acțiune hemolitică, transformă hemoglobina în methemoglobină. Nu lichefiază gelatina. Reduce nitrații în nitriți. Produce slab H_2S, nu reduce albastrul de metilen, nu produce indol. Reacția roșu de metil și Voges-Proskauer sînt negative. Acidifică ușor laptele, coagulîndu-l în 2–3 săptămîni.

Rezistența la acțiunea agenților fizici, chimici și biologici. În afara organismului este puțin rezistent. Puroiul uscat devine steril în cîteva zile.

În culturi rezistă cîteva săptămîni (4–6 săptămîni). Mediile cu ou, tip mediul Dorset, prezervă mai bine culturile.

Căldura îl omoară în 10 minute la 55° și în cîteva secunde la 100°. Este sensibil la acțiunea fenolului, care-l distruge într-o oră la concentrație de 2%. Sublimatul 1/1 000 îl omoară în 15 minute. Permanganatul de potasiu 1/100 şi apa clorinată îl distrug de asemenea, hipocloritul de calciu 1/10 000 îl omoară în 30 de minute.

Este sensibil la sulfamide — sulfatiazol (Munţiu, 1943), sulfadiazină (Howe şi Miller, 1947) şi sulfametazină (Deyhimi şi Khatai, 1951). Rezistent la acţiunea penicilinei. *In vitro* este sensibil la streptomicină şi aureomicină; *in vivo* aceste antibiotice se arată însă puţin eficiente.

Structura antigenică. Sakamoto (1930) a izolat din filtratele de cultură o nucleoproteină nespecifică şi un polizaharid specific, solubil, care precipită în prezenţa serului imun.

Barber şi Munţiu au pus în evidenţă un antigen glucido-lipido-polipeptidic (glucide 40—48%, lipide 18—24%, azot 4,4—5,4%), în cantităţi aproape egale la cele 2 forme „S" şi „R".

Prin reacţii de aglutinare şi teste de absorbţie s-au pus în evidenţă cel puţin 2 tipuri serologice. Unul din aceste tipuri, pare legat de *B. whitmori*.

Caractere de patogenitate. Bacilul morvei nu secretă o toxină solubilă. Posedă însă o endotoxină, termorezistentă, care este pusă în libertate după autoliza germenului. Rezistă la 100° şi 120°, pierzînd doar o parte din activitatea sa.

În culturile vechi, germenii se autolizează şi endotoxina morvoasă, solubilizată în mediu, constituie partea activă şi specifică a extractelor de cultură, cunoscută sub numele de maleină.

Maleina a fost descrisă pentru prima oară de către veterinarul rus Helman, care a preparat-o prin macerarea prelungită în apă glicerinată de culturi pe cartof; produsul lichid, sterilizat prin căldură, era apoi filtrat.

Roux a preparat maleina din culturi în bulion glicerinat 5%, incubate 30 de zile la 35°, sterilizate apoi prin încălzire la 100°, 30 de minute, filtrate şi concentrate prin evaporare la a zecea parte din volum.

Babeş a preparat morvina din culturi virulente pe cartof, culturi vechi de 5—6 săptămîni, suspensionate în apă şi sterilizate la 68°, 3 ore şi jumătate. Suspensia era apoi filtrată şi filtratul tratat cu alcool. Precipitatul obţinut era spălat cu alcool, cu eter şi apoi uscat la vid.

Boala la om. La om, infecţia morvoasă este accidentală, fiind generată de contactul cu animalele. Poate evolua ca infecţie acută şi excepţional de rar ca infecţie cronică. Calea de pătrundere a germenului în organism este calea mucoaselor (pituitară sau conjunctivală), ori calea cutanată prin înţepătură accidentală. Infecţia prin mucoasa pituitară se complică de bronhopneumonie şi are o evoluţie acută. Infecţia pe cale cutanată produce o leziune locală, o veziculă, care devine pustulă, de unde leziunea se întinde pe cale limfatică dînd limfangită, adenită, leziuni care se pot generaliza în tot sistemul cutanat, dînd o erupţie pustulo-papuloasă, cu noduli subcutanaţi şi intramusculari dureroşi care abcedează, fistulizează.

Trecerea germenilor în sînge duce la producerea de granulaţii miliare în organe.

Boala generalizată se însoţeşte de fenomene generale, febră, frisoane, cefalalgii, dureri articulare, stare de intoxicaţie profundă. Netratată, dă o mortalitate de 100%. In forma cronică, morva se prezintă la om cu limfangită şi abcese periarticulare şi musculare.

Leziuni anatomopatologice. Tuberculii morvoşi se aseamănă cu cei tuberculoşi. *Ac. mallei*, înglobat mai întîi de polinucleare, este atacat apoi de mononucleare, ducînd la formarea unui folicul conţinînd o celulă gigantă.

Ramolirea tuberculilor este mai apropiată de supuraţie decît de cazeificare.

Boala spontană la animale. Solipedele prezintă boala spontan, putînd de asemenea evolua ca infecţie acută sau cronică:

În forma acută, boala debutează după 6—8 zile de incubaţie, prin pustule situate la suprafaţa mucoasei nazale, ducînd la ulceraţie şi însoţite de o secreţie numită jetaj (forma morvoasă). Ulterior coriza se întinde la plămîn, producînd bronhopneumonie. Moartea survine în hipertermie în 8—10 zile.

În cazul infecţiei pe cale tegumentară sau ca localizare secundară, se pot dezvolta leziuni pustuloase şi ulcerative la nivelul pielii. Infecţia se propagă pe cale limfatică, cu prinderea cordoanelor limfatice şi hipertrofia ganglionilor limfatici (forma farcinoasă, tuberculi morvoşi).

Trecerea microbului în sînge duce la producerea de tuberculi morvoşi în viscere. Forma cronică cunoaşte aceleaşi localizări.

Infecţia experimentală. *Solipede.* Cel mai sensibil este măgarul, apoi catîrul, şi la urmă calul.

La măgar se observă mai ales forma acută, la catîr cea subacută, iar la cal cea cronică.

Inocularea pe cale subcutanată produce, la cal, o leziune ulceroasă la locul inoculării, cu prinderea limfaticelor regionale şi evoluţie cronică; la măgar boala are evoluţie acută, debutînd după o incubaţie de 3 zile, cu febră 40°, edem local şi ulceraţie, cu moarte în 5—20 de zile. Inocularea pe cale intravenoasă este mai severă. Depunerea produsului pe conjunctivă sau pituitară cu frecare ulterioară, asigură infecţia. Pe cale trahealä nu se obţine infecţia.

Pe cale orală se obţine în mod constant.

Experimental, boala a mai putut fi transmisă la capră, pisică, hamster, cămilă, cobai. Maimuţa, oaia, cîinele, şobolanii, şoarecii, iepurii sînt puţin sensibili.

Porcul, vitele sînt refractare, găina de asemenea.

Cobaiul răspunde cel mai fidel la infecţia experimentală. Inocularea pe cale intraperitoneală produce la cobaiul mascul prinderea seroasei vaginale, în interval de 2 zile (semnul lui Strauss). După 3—4 zile, cele 2 foiţe ale seroasei vaginale sînt prinse într-un exsudat gros, purulent, galben. Pielea scrotului este îngroşată, aderentă, se ulcerează; urmează moartea animalului în 14 zile. În afară de leziunile testiculare, se observă noduli miliari în splină, noduli în plămîni, ficat, noduli subcutanaţi, abcese periarticulare. Cobăiţele sînt mai puţin receptive. Mamelele şi labiile pot fi inflamate.

Inocularea pe cale pleurală determină un epanşament bilateral, cu moarte în 36 de ore.

Inocularea pe cale subcutanată poate determina, în funcţie de numărul germenilor: o simplă formaţiune nodulară subcutanată sau un abces local, cu ulceraţie, adenită concomitentă, moarte în circa 50 de zile. Nu se observă localizări nazale.

Inocularea pe cale sanguină duce la o infecţie generalizată severă.

Cămila, foarte sensibilă, dezvoltă forma acută.

Iepurele, puţin receptiv, tolerează inocularea intraperitoneală. Infectat pe cale intravenoasă, moare în 15—40 de zile. Inoculat subcutanat, dezvoltă local o ulceraţie, cu prinderea ganglionilor.

Şoarecele este mai puţin rezistent decît se credea.

Imunitate. Unele specii animale posedă o rezistenţă naturală faţă de infecţia morvoasă : păsările, porcii, vitele sînt absolut refractare; alte animale posedă o imunitate relativă : capră, oaie. Pe de altă parte, în sînul speciilor sensibile se pot întîlni anumiţi indivizi, posedînd o imunitate naturală.

Imunitatea dobîndită prin trecerea prin boală este slabă şi de scurtă durată, reinfectarea experimentală fiind dovedită.

Încercările de imunizare activă cu ajutorul a diferite vaccinuri corpusculare sau cu ajutorul maleinei au dat rezultate disparate şi inconstante.

Tratament. Este astăzi un fapt bine dovedit că morva este o boală tratabilă. Acţiunea antiinfecţioasă a sulfamidelor a găsit o largă aplicare în tratamentul morvei. Chimioterapia acestei boli poate fi realizată cu sulfatiazol (Munţiu), sulfadiazină (Howe şi colaboratorii) sau cu sulfametazină (Deyhimi şi colaboratorii). Chimioterapia necesită un tratament de minimum 25 de zile, asociat cu tratamentul biologic : anamorvă, maleină sau antigen purificat, capabil, pe de o parte, să stimuleze mijloacele de apărare ale organismului, iar pe de alta, să favorizeze pătrunderea chimioterapicului în intimitatea leziunilor.

Acest tratament condiţionează vindecarea clinică în 2—3 săptămîni şi duce la sterilizarea organismului şi la negativarea treptată a reacţiei la maleină şi a reacţiilor serologice.

Penicilina este fără efect; streptomicina şi aureomicina au oferit rezultate inconstante *in vivo*.

Diagnosticul de laborator

Se bazează pe : izolarea agentului cauzal din produse patologice şi identificarea lui prin caractere morfologice, de cultură, biochimice; testul patogenităţii (testul Strauss), cercetarea anticorpilor specifici în ser (diagnostic serologic); testul biologic—reacţii cutanate de diagnostic.

1. *Izolarea germenului din produse şi identificarea lui.* Produsele de cercetat sînt : puroi, secreţii, produse recoltate la nivelul leziunilor. Hemocultura este de obicei negativă, exceptînd faza terminală a bolii.

Conduita examenului. Se efectuează frotiuri directe din produse, colorate cu albastru de metilen concentrat, albastru de toluidină sau tionină fenicată. Se fac însămînţări pe medii glicerinate : geloză 2% glicerinată 5%; cartof glicerinat.

Puroiul recoltat din leziuni nedeschise se însămînţează ca atare; secreţiile sau produsul de raclare al leziunilor deschise trebuie însămînţate în medii conţinînd 200 u. penicilină pe ml, pentru a opri dezvoltarea florei de suprainfecţie (Munţiu). Pentru produsele provenind de la cazuri tratate cu sulfamide, se recomandă adăugarea la mediile de cultură de acid paraaminobenzoic (Munțiu și Nemțeanu).

Se procedează apoi la identificarea prin caractere biochimice și de cultură. Identificarea biologică prin testul patogenității (testul Strauss), constă din inocularea suspensiilor microbiene, intraperitoneal la cobaiul mascul. Congestia și tumefierea testiculelor în interval de 2—3 zile de la inoculare indică o reacție pozitivă. Se fac frotiuri și culturi din puroiul testicular, exsudatul peritoneal, și splina animalului inoculat. Diagnosticul diferențial se face cu *B. Whitmori*.

2. *Testul patogenității* (*testul Strauss*), prin inoculare intraperitoneală la cobaiul mascul, se poate practica direct cu puroiul sau cu fragmente de țesut ulcerat, după prealabilă adăugare de penicilină 200 u/ml, pentru inhibarea germenilor de suprainfecție (Munțiu).

3. *Diagnosticul serologic*. Se efectuează următoarele reacții:

Cercetarea aglutininelor în ser. La om, aglutininele specifice apar a 5-a — a 6-a zi de la infecție, ajung la titru maxim după 2—3 săptămîni, scad în formele cronice sau după tratament. Pot persista circa 1 an, după care dispar.

Pentru efectuarea reacției de aglutinare se va folosi ca antigen o tulpină de *Ac. mallei*, cunoscută ca aglutinabilă și recent trecută prin animal, cultură de 48 de ore pe geloză glicerinată suspensionată în ser fiziologic (0,01 g în 20 ml ser fiziologic) și inactivată 2 ore la 60°. Se fac diluții din serul de cercetat, la care se adaugă suspensia antigenică. Citirea reacției se face după incubare de 24 de ore la 38°.

Se observă creșterea titrului aglutininelor pînă la 1/1 000 —1/2 500 ori mai mult, la 2—3 săptămîni de boală, după care titrul scade, o dată cu trecerea bolii la cronicizare. Serul normal de cal aglutinează pînă la 1/200—1/500. O reacție de aglutinare pozitivă la diluția 1/900 este considerată suspectă, iar peste 1/1 000, sigur pozitivă.

Reacția de precipitare se efectuează folosind serul de cercetat inactivat la 55° și maleină diluată 1/10 în ser fiziologic. Citire după 18—20 de ore la temperatura laboratorului. Reacția are o specificitate redusă, fiind pozitivă și la unele seruri normale. Nu se folosește în practică.

Reacția de fixare a complementului. Este mai sensibilă decît reacția de aglutinare. Apare mai tardiv, dar persistă multă vreme, fapt pentru care prezintă valoare diagnostică, mai ales în formele cronice. Ca antigen se folosește, fie maleină diluată 1/5 000 (A. Ciucă), fie suspensie de corpi microbieni preparată astfel: cultura de 6 zile în bulion glicerinat este inactivată prin încălzire la 60°, timp de 2 ore. Se centrifughează și sedimentul este apoi spălat de 2 ori cu ser fiziologic și tratat cu alcool și eter în părți egale. După 24 de ore se decantează lichidul, iar corpii microbieni sînt uscați la etuvă la 37°, în vid. Se triturează în mojar și se pregătește suspensia antigenică, 0,01 g pentru 50 ml ser fiziologic. Se repartizează cîte 0,3 ml de fiecare tub de reacție.

Tot ca antigen se pot folosi și extracte purificate.

Antigenul glucido-lipido-polipeptidic fixează complementul în doze de 0,15γ (Munțiu, Barber, Heytmanek).

Reacția de fixare a complementului permite decelarea infecției morvoase în aproximativ 99% din cazuri. Howe și Miller consideră reacția de fixare a complementului pozitivă la titrul minim de 1/20.

Reacția de conglutinare a fost preconizată pentru diagnosticul morvei încă din 1912–1913, de către Pfeiffer și Weber.

Principiul metodei constă în proprietatea pe care o are serul normal de bou de a conglutina hematiile de oaie sensibilizate în prezența alexinei din serul normal de cal.

Punînd în contact antigen morvos cu anticorp morvos, cu ser normal de cal și cu hematii de oaie, reacția specifică dintre primele trei elemente va împiedica conglutinarea hematiilor de oaie de către serul de bou adăugat ulterior. Lipsa reacției de conglutinare indică un rezultat pozitiv pentru morvă.

Această reacție a fost folosită mai ales pentru serurile cu putere anticomplementară, fiind pozitivă în circa 93% din cazurile de boală clinică.

Reacția K. H. sau reacția de fixare a complementului modificată se bazează pe proprietatea serului încălzit de bou, de a liza globulele de cobai în prezența alexinei din serul normal de cal. La adăugarea unui ser provenind de la un animal morvos, hemoliza nu se produce, iar hematiile sînt aglutinate de serul de bou.

Reacția de hemaglutinare pasivă a hematiilor sensibilizate prin antigene morvoase (extracte de bacili morvoși) este recomandată de unii autori (Munțiu, Barber și Andrian 1957) ca fiind tot atît de precoce ca reacția de aglutinare, dar mai specifică decît aceasta. De asemenea, această reacție apare foarte utilă în cazul serurilor cu putere anticomplementară care dau rezultate dubioase în fixarea complementului. Serurile pozitive pot hemaglutina hematiile sensibilizate, pînă la diluția 1/128.

4. *Testul biologic* este reprezentat prin reacții cutanate de diagnostic. Antigenul folosit astăzi în cele mai multe țări este maleina. Reacțiile cutanate folosite sînt:

a) La om: — *dermoreacția* se efectuează prin depunerea pe pielea rasă a antebrațului, a unei picături de maleină brută. Apariția unei zone de hiperemie însoțită de edem dureros și pruriginos indică o reacție pozitivă. Intensitatea maximă a reacției se observă cam la 30 de ore (Martel);

— *intradermoreacția* se efectuează folosind maleină diluată 1/1 000–1/10 000;

— *subcutireacția* constă din inocularea a 2 ml maleină diluată 1/10. Apariția unei tumefacții voluminoase la 8–10 ore de la inoculare, însoțită de febră 40° sau mai mult, arată o reacție pozitivă.

Este o reacție aplicabilă numai cînd celelalte au dat rezultate dubioase.

b) La animal: — *cutireacția* cu depunerea antigenului pe o zonă scarificată. La 24 de ore, reacția pozitivă este indicată de apariția unei tumefacții edematoase;

— *oftalmoreacția* constă din depunerea a 2 picături de maleină brută, diluată 1/4, în sacul conjunctival.

În cazul unei reacții pozitive, se produc congestia mucoasei oculare, infiltrația conjunctivei, tumefacția pleoapei inferioare, exsudat purulent;

— *intradermoreacția palpebrală* se efectuează prin inocularea în dermul pleoapei inferioare a 0,1 ml maleină diluată 1/4. Apariția unui edem palpebral, indică o reacție pozitivă.

În afară de maleină, pentru efectuarea testelor biologice s-au mai încercat și diferite alergene, începînd cu morvina, descrisă de Babeș, antigenul glucido-lipido-polipeptidic obținut de Munțiu, Barber și Heytmanek (1959), prin extracție cu acid tricloracetic sau extractul alcalisolubil obținut de Stamatin, Bogdan și Cîrsteț (1952) etc.

Epidemiologie

Morva la animale. Morva era înainte vreme o boală răspîndită în Europa, interesînd mai ales solipedele. În urma aplicării cu strictețe a măsurilor de profilaxie și combatere, constînd din folosirea sistematică a maleinei și asanarea metodică a focarelor de infecție, incidența morvei a scăzut în toate țările, în unele fiind chiar eradicată (U.R.S.S., Franța, Anglia, Norvegia etc.). La noi în țară, ca și în alte țări învecinate, numărul cazurilor de morvă înregistrate este foarte scăzut (Munțiu).

Specii sensibile. Solipedele (cal, măgar, catîr) sînt cele mai receptive animale la infecția morvoasă. Capra, oaia, cîinele, pisica pot face uneori boala prin infecție spontană, în timp ce vitele, porcii și mai ales păsările sînt refractare.

Modul de infectare. Contagiul se realizează prin secrețiile nazofaringiene (produs de jetaj) ale animalelor bolnave care prezintă localizări nazale, laringiene, traheale, ca și prin puroiul leziunilor farcinoase. De asemenea, urina și materiile fecale putînd servi drept cale de eliminare a germenilor pot asigura transmiterea infecției. Animalele sensibile, venind în contact în mod direct sau indirect cu aceste produse, se contaminează.

Morva la om. Boala interesează în special pe cei care, prin profesiunea lor, vin în contact cu animalele (veterinari, îngrijitori de animale, vizitii etc.).

Modul de infecție. De cele mai multe ori, infectarea omului se face prin contaminarea cu material morvos a unei zgîrieturi sau plăgi. Infecția pe cale nazală nu este exclusă.

S-au semnalat de asemenea infecții de laborator produse de diverse accidente în cursul manipulării culturilor sau a animalelor infectate experimental.

Profilaxie

Cum rezervorul de infecție al morvei la om îl constituie fără îndoială solipedele, profilaxia morvei umane este indisolubil legată de profilaxia morvei la animale. Printre măsurile profilactice, trebuie deosebite, pe de o parte, măsuri cu caracter sanitar (depistarea precoce și sacrificarea animalelor clinic bolnave, carantinarea și supravegherea celor care au reacționat pozitiv la proba alergică cu maleină sau la examenul serologic), iar pe de altă parte, măsuri de chimioprofilaxie. Aceasta din urmă se bazează pe aceleași principii ca și chimioterapia, folosind acțiunea antiinfecțioasă a sulfamidelor. Tratamentul profilactic necesită același dozaj pe kilocorp ca și cel curativ, dar pe o perioadă mai scurtă de timp (5–10 zile). El trebuie aplicat, atît la om, cît și la animal după infecția probabilă sau numai bănuită (Munțiu).

Moraxella lacunata

Făcînd parte din aceeași familie *Brucellaceae* – genul *Moraxella*, acest germen a fost cunoscut în trecut sub numeroase alte denumiri, printre care: diplobacilul conjunctivitei subacute, Morax; diplobacilul conjunctivitei cronice, Axenfeld; *Bacterium conjunctivitis*, *Diplobacillus moraxaxenfeld etc.*

De formă bacilară, așezat izolat, în diplo sau lanțuri scurte, *Moraxella lacunata* este lipsit de mobilitate, gram-negativ.

Crește greu și numai pe medii conținînd lichide organice: ser sanguin, ascită, sînge.

Însămînțat în bulion-ascită, tulbură slab mediul.

Pe geloză-ser, geloză-ascită, geloză-sînge, nu crește la prima izolare, dezvoltîndu-se cu greutate doar în subculturi.

În gelatină, lapte turnesolat, cartof, nu crește. Unele tulpini lichefiază lent și limitat serul coagulat și au oarecare acțiune hemolitică.

Determină conjunctivita subacută.

Pseudomonas pseudomallei

Agentul cauzal al melioidozei este un germen asemănător, în unele caracteristici ale sale, cu *Actinobacillus mallei*, fiind la un moment dat chiar inclus în același gen cu acesta.

A fost izolat de către Whitmore și Krishnaswami, în 1912, care l-au denumit *Bacillus pseudomallei*. Ulterior a fost descris și sub alte denumiri, printre care: *Bacillus whitmori*, *Malleomyces pseudomallei*, *Loefflerella pseudomallei*, *Pfeifferella pseudomallei*.

Este parazit la rozătoare și om.

Germenul se prezintă sub forma unui bacil scurt, dispus izolat sau în lanțuri scurte, mobil. Se colorează bipolar, gram-negativ. Însămînțat în bulion, tulbură mediul, formînd peliculă la suprafață.

Pe geloză dezvoltă colonii rotunde, ușor reliefate, groase, opace, cremoase.

Aerob și facultativ anaerob se dezvoltă în condiții optime la 37°.

Lichefiază gelatina și serul coagulat. Coagulează laptele, nu produce indol.

Fermentează glucoza, maltoza, lactoza, zaharoza și manita.

Unele tulpini elaborează un pigment galben.

La om produce *melioidoza*, boală septicemică, cu localizări supurative sau cazeoase în plămîni, splină, ficat, rinichi. Clinic, boala are o evoluție de obicei scurtă, cu moarte în 3–4 săptămîni. S-au descris și forme cronice.

La animale (cobai, iepuri) boala începe cu catar acut, ocular şi nazal, urmat de dispnee şi moarte. La examenul necropsic se observă noduli miliari la nivelul mucoasei nazale, noduli cazeoşi şi focare de necroză în plămîni, splină, ficat.

În mod spontan s-au descris îmbolnăviri la şobolani sălbatici şi doar excepţional la pisică, oaie, cal.

Calea de contaminare a omului ar putea fi calea cutanată sau cea alimentară.

Diagnosticul de laborator se bazează pe izolarea germenului din abcese, pustule superficiale, sînge sau urină, pe medii cu glicerol şi prin reproducerea bolii la cobai sau hamsteri.

Genul Brucella şi infecţia bruceloasă

Prof. N. Nestorescu şi dr. Ofelia Dimitriu

După Renaux (1961), Genul *Brucella*, care aparţine familiei *Brucellaceae*, nu ar conţine decît o singură specie — *Br. melitensis* — care ar avea mai multe varietăţi : *Br. melitensis*, *Br. abortus*, *Br. suis*, *Br. thomseni*, *Br. lisbonnei*, *Br. intermedia*, *Br. ovis* şi eventual altele care ar mai putea fi în viitor caracterizate.

Subcomitetul de taxonomie pentru *Brucella* (1963) opinează însă pentru menţinerea în interiorul Genului *Brucella* a trei specii : *Br. melitensis*, *Br. abortus* şi *Br. suis*, fiecare specie putînd avea mai multe biotipuri. Infecţia bruceloasă este cea mai răspîndită antropozoonoză de pe suprafaţa globului, ea provoacă infecţii acute şi cronice cu localizări multiple la om şi avortul epizootic la animale.

Istoric. Infecţia bruceloasă, a fost scoasă în evidenţă în 1859, de către Marston, iar denumirile de „febră mediteraneană" sau „febră ondulantă" i-au fost date de Hughes. În 1886, Bruce izolează agentul cauzal de la cadavru.

Habitat. Germenii din genul *Brucella* au ca habitat oamenii, mamiferele domestice şi sălbatice, păsările, artropodele etc., care le servesc ca gazde, putînd supravieţui temporar, în lapte, carne, lînă, praf, apă poluată, gunoi etc.

Caractere morfologice. Brucelele sînt în general cocobacili de 0,6—12 µ lungime şi 0,5—0,7 µ grosime. Polimorfism, uneori accentuat (cocobacili, bacili, filamente). Sînt imobili. După unii autori prezintă capsulă vizibilă pe electronografii. Prezenţa capsulei este deseori legată de faza „S", „R" şi mai ales a formei „M" a germenilor.

Caractere de cultură. Pe medii lichide, dezvoltarea brucelelor este lentă (2—7 zile). Mediile se tulbură uniform, la fundul tubului depunîndu-se un depozit care, prin agitare, se ridică în vîrtej. Pe medii solide, coloniile se dezvoltă în 48—72 de ore ; la început mici, punctiforme, transparente, lucioase, cu irizaţii verzui pe margini, cînd germenii sînt de forma „S" şi opace-gălbui, cînd sînt în formă „R". După Pacheco, observate la lupă şi iluminare oblică, pe fond negru, coloniile diferă după faza de disociere

„S", „I" (intermediar), „R" şi „M" (mucoide). Forma coloniilor este reversibilă.

Brucelele se multiplică pe membrana corio-alantoidă a oului de găină, embrionat, determinînd moartea embrionului în cîteva zile, cu leziuni în splină şi ficat. De asemenea, ele pot creşte intracelular. Astfel, *Br. melitensis* are predilecţie pentru epiteliul ectodermal, iar *Br. abortus* şi *Br. suis* în celule de origine mezodermală şi în endoteliul vascular.

Caractere biochimice şi de metabolism. Germenii din grupul *Brucella*, deşi necesită prezenţa oxigenului atmosferic, se comportă cu totul particular în raport cu acesta din urmă. Astfel *Br. abortus* nu creşte pe un mediu solid în condiţii de aerobioză, mai ales la izolare şi la primele subculturi, cu toate că nu este un germen microaerofil. Această variantă creşte însă bine într-o atmosferă care conţine CO_2, 5—10%. Acelaşi lucru se constată şi cu unele tulpini de *Br. melitensis* şi chiar cu tulpini de *Br. suis*. Necesitatea de CO_2 pare să fie legată de stimulul iniţial al creşterii germenilor, mecanismul constînd în schimbarea pH celular şi a potenţialului de oxido-reducere, ca urmare a traversării gazului prin peretele membranei celulare.

Temperatura optimă de creştere a germenilor din genul *Brucella* este 37°; la 20° creşte slab; pH optim este între 6,6 şi 7,2. La pH 6,6 cresc mai bine la izolarea din organismul infectat şi la primele subculturi; la pH 7,2 cresc mai bine tulpinile de colecţie.

Brucelele au nevoie de numeroşi factori de creştere; printre aceştia pot fi amintiţi: tiamina, acidul nicotinic, acidul pantotenic şi biotina. Glucoza permite o creştere mai abundentă a culturilor.

Brucelele, deşi considerate ca lipsite de activitate asupra glucidelor, s-au dovedit capabile să fermenteze un număr de zaharuri. Dăm în tabelul LXII zaharurile fermentate de speciile de *Brucella*.

Tabelul LXII

Fermentarea zaharurilor de către brucele
(după Pickett şi Nelson)

Brucella	Zaharuri																		
	g	x	s	l	a	e	r	s	s′	d	i	g	l	m	s	r	a	a	g
Br. melitensis	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±	±
Br. abortus	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±	±
Br. suis	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±	±
Br. neotoma lepida	+	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+							
Br. ovis: nu atacă nici un zahar	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Legendă:
g = glucoză; x = xiloză; s = sucroză; l = levuloză; a = arabinoză; e = eritritol; r = riboză; s = sorboză; s′ = sorbitol; d = dulcitol; i = inulină; g = galactoză; l = lactoză; m = manitol; s = salicină; r = rafinoză; a = amidon; a = adonită; g = glicerol.

Acizii formaţi prin fermentare sînt repede neutralizaţi prin alcalii rezultaţi din desfacerea proteinelor, ceea ce împiedică punerea lor în evidenţă cu ajutorul indicatorilor. Amoniacul este produs din peptonă, uree şi asparagină. Alcalinizează laptele turnesolat. Produc reducerea nitraţilor în nitriţi. Nu atacă gelatina şi nu produc indol. Produc H_2S. Reacţiile roşu de metil şi Voges-Proskauer sînt negative.

Brucelele au un echipament enzimatic bogat; unele din enzime, în raport cu intensitatea activității lor, au fost folosite în scop de diferențiere a speciilor și variantelor existente. Cercetarea activității ureazei, catalazei, lipazei și amilazei a fost pe rînd introdusă printre metodele de diferențiere a brucelelor. Unele tulpini de *Br. melitensis* sînt hemolitice.

Redăm în tabelul LXIII metodele convenționale de diferențiere a celor trei specii de *Brucella*.

Tabelul LXIII

Specii	Cerințe în CO_2	H_2S	Crește pe		Aglutinare cu seruri monospecifice	
			tionină	flucsină bazică	*abortus*	*melitensis*
1. *Br. melitensis*	—	—	+	+	—	+
2. *Br. abortus*	+	+ 4 zile	—	+	+	—
3. *Br. suis*	—	++5 zile	+	—	+	—

Rezistența germenilor la agenții fizici, chimici și biologici. Germenii din genul *Brucella* sînt relativ rezistenți. La 4° trăiesc 3—6 luni; liofilizați, trăiesc cel puțin 5 ani (Dimitriu și colaboratorii). Viabilitatea lor nu dispare nici în sînge, lapte, carne, dacă aceste produse sînt conservate la frig. Laptele infectat natural, menținut la 0° îi păstrează viabili 40 de zile, apa de fîntînă la 0°, 106 zile, smîntîna la 0°, 40 de zile (Viselevski și Versilova).

Căldura umedă distruge brucelele în 15 minute la 60° și numai în 30 de secunde la 71°. Căldura uscată îi omoară într-o oră la 95°.

Rezistența brucelelor la uscăciune este relativ mare; ele sînt viabile pînă la 38 de zile în praf și 60 de zile în pămîntul uscat de grădină.

Agenții chimici acționează variabil asupra brucelelor. Alcoolul de 90° le distruge instantaneu; acidul salicilic 1/1 000, glicerina 1/10 și permanganatul de potasiu 1/5 000 în 10 minute. Sublimatul 1/1 000, timolul 2,5% și formolul 2% în 15 minute.

După Pacheco, brucelele sînt foarte sensibile la mentol (0,1%).

Supuse acțiunii coloranților, brucelele suferă un efect bactericid. Mecanismul de acțiune a coloranților pare să rezide în inhibarea acțiunii enzimelor acestor bacterii; după Cameron, tionina inhibează disulfhidraza *Br. suis*. Acțiunea bactericidă a substanțelor colorante este direct proporțională cu concentrația lor în mediu și invers proporțională cu numărul germenilor însămînțați.

Și unii acizi aminați posedă o activitate bactericidă asupra brucelelor; astfel d-fenilalanina și d-metionina sînt destul de active în această privință.

Antibioticele ca aureomicina, bacitracina, streptomicina și cloramfenicolul acționează puternic asupra brucelelor, însă sulfatiazolul și nitrofuranul nu au nici o acțiune (O. Dimitriu și colaboratorii).

Germenii din genul *Brucella* sînt sensibili și la acțiunea bacteriofagului specific. Izolat pentru prima oară de către Popkadze și Abashidze în 1955 și ulterior de Drojevkina din gunoiul de grajd, bacteriofagul antibrucelos se arată activ față de brucele într-un procent foarte ridicat. În țara noastră, Dimitriu, Cerbu și Vasilescu, cercetînd activitatea bacteriofagului antibrucelos, atît pe tulpini indigene de *Brucella*, cît și pe tulpini de colecţie, străine, au arătat că tulpinile de *Br. abortus* sînt sensibile 100%, tulpinile de *Br. melitensis* în 77%, în opoziţie cu tulpinile aparţinînd *Br. suis*, care s-au dovedit rezistente, aproape în totalitate.

Structura antigenică. Brucelele posedă o structură antigenică complexă; studiată mai întîi de către Wilson şi Miles (1936), cu ajutorul serurilor aglutinante adsorbite, aceşti autori au pus în evidenţă două antigene denumite „A" şi „M", stabilind totodată şi repartiţia lor cantitativă în primele trei variante de *Brucella* menţionate mai sus.

Astfel *Br. melitensis* conţine 95 de părţi antigen „M" şi 5 părţi antigen „A", *Br. abortus*, 95 de părţi antigen „A" şi 5 părţi antigen „M" iar *Br. suis* 60 de părţi antigen „A" şi 40 de părţi antigen „M".

După Renoux şi Mahaffey (1955), germenii din genul *Brucella* conţin patru antigene: „A", „M", „Z", „R". Antigenul „A" formează antigenul de suprafaţă al *Br. abortus* şi *suis*; antigenul „M" constituie antigenul de suprafaţă al *Br. melitensis*. Antigenul „Z" este propriu *Br. ovis*, pe cînd antigenul „R" se întîlneşte la toate aceste patru specii, localizarea sa în germen fiind însă profundă, în centrul corpului microbian.

Olitzki (1960), folosind metoda precipitării şi difuziunii în gel, pune în evidenţă la toate speciile de *Brucella* 6 antigene diferite, a căror repartizare cantitativă este neuniformă de la o specie la alta.

În sfîrşit, în afara acestor antigene specifice, brucelele mai conţin o serie de antigene de grup, comune la diverşi germeni, printre care vibrionul holeric, *Salmonella enteritidis*, *B. proteus*, *P. tularensis*. Prezenţa acestor antigene de grup creează uneori dificultăţi la identificarea acestor germeni.

Natura chimică a antigenelor bruceloase a făcut obiectul a numeroase cercetări. Huddleson (1933) a pus în evidenţă la germenii din genul *Brucella* proteine inactive, polizaharizi şi lipide care au variat cantitativ după speciile de *Brucella*. În 1938, Dîmboviceanu, Barber şi Pop au obţinut un extract antigenic complet, format din polizaharizi, acizi graşi şi o substanţă de natură polipeptidică. În 1961, Barber, Dimitriu şi colab. au arătat că antigenul „M" este un poliozid constituit din glucoză cu urme de manoză şi arabinoză, asociat cu o fracţiune azotată. Cantitatea acestor substanţe varia de la o specie la alta. Miles şi Pirie în 1939, folosind extracţia cu ajutorul fenolului sau al cloroformului, pun în evidenţă o substanţă la forma „S" a *Br. melitensis*, pe care au denumit-o Plaps (phosphor-lipoid-amino-polihydroxy-substance) şi care s-a dovedit de două ori mai toxică decît germenii întregi uscaţi; această substanţă este puternic antigenică şi scade cantitativ în formele „S"—„R" ale germenilor. Dubrowskaia (1954) extrage un complex glico-lipo-proteic, care conţine pe lîngă o substanţă polizaharidică şi acid dezoxiribonucleic. În fine, Barber, Pop, Dimitriu şi Vasilescu obţin din brucele 6 extracte diverse, cărora le studiază activitatea revelatoare a alergiei bruceloase, comparativ cu brucelina, arătînd că unul din aceste extracte — brucelhidrolizatul Kotliarova — posedă o activitate superioară brucelinei.

Caractere de patogenitate: germenii din genul *Brucella* îşi manifestă patogenitatea mai cu seamă prin virulenţă. Virulenţa unei tulpini de *Brucella* poate fi cercetată fie prin persistenţa germenilor în curentul circulator, fie prin persistenţa germenilor în organe, pusă în evidenţă prin izolarea acestora, fie în fine, prin doza minimă infectantă de germeni.

Virulența depinde de specia de brucelă, de forma în care se găsesc germenii — „S", „I", „R", „M", ca și de receptivitatea animalelor folosite. Astfel, pentru tulpinile virulente de *Br. melitensis* și *Br. suis* doza minimă infectantă poate fi 2—5 germeni, pe cînd pentru *Br. abortus* 3—100 germeni.

Deverell, inoculînd în sacul vitelin al embrionului de găină, în vîrstă de 7 zile, numai un singur germen de *Br. abortus*, a obținut moartea embrionului.

Toxicitatea germenilor pare să fie legată de substanța glucido-lipido-polipeptidică a germenilor.

Huddleson și Pennell, și mai ales Pacheco, au studiat cu multă amănunțime toxicitatea acestor substanțe. Folosind filtrate de cultură și extrase obținute după dezintegrarea germenilor prin înghețări și dezghețări succesive, inoculate la animale de laborator pe cale intravenoasă sau peritoneală, Pacheco a obținut leziuni importante și în sistemul nervos central. Nu se cunoaște pînă în prezent o exotoxină elaborată de acești germeni, cu toate că după Minoprio manifestările nervoase observate uneori în bruceloza umană ar fi datorite unei toxine neurotrope.

Boala la om. Infecția bruceloasă la om îmbracă aspecte clinice diferite, după specia de *Brucella* care o cauzează.

Astfel, infecția cu *Br. melitensis* se manifestă mai ales sub formă acută, pe cînd *Br. abortus* și *Br. suis* se manifestă mai totdeauna sub formă cronică sau inaparentă.

După o perioadă de incubație care variază după specia microbiană (după Zdrodovski pentru *Br. melitensis*, această perioadă poate fi de 7—21 de zile) se instalează o perioadă de stare care corespunde pătrunderii germenilor în curentul circulator și reținerii germenilor în organe și țesuturi. Această perioadă poate dura săptămîni și luni de zile. Concomitent, urmează faza dezvoltării leziunilor bruceloase caracteristice — granulomul brucelos — cu localizări în mai toate organele.

În formele acute cauzate de *Br. melitensis*, febra mai întîi continuă, datorită unei septicemii susținute, ia ulterior un caracter ondulant, care alternează cu perioade subfebrile sau de afebrilitate de durată variată.

În infecțiile cauzate de *Br. abortus* și *Br. suis*, aspectul ondulant al febrei este mult mai rar întîlnit; de obicei este neregulat, boala înfățișîndu-se cu forme subfebrile sau afebrile.

Pe lîngă febră, bruceloza este caracterizată prin oboseală la efort, dureri articulare, insomnii, cefalee rebelă, sudori, în afară de simptomele legate de localizarea infecției pe anumite organe: plămîn, ficat, splină, testicul, uter, sistem nervos, oase, piele etc.

După depășirea formei acute care duce la moarte în 3—5% din cazuri, bruceloza poate evolua ani de zile sub formă cronică, întreruptă de recăderi.

Boala spontană la animale. Printre animalele care contractă bruceloza în mod spontan, mai des întîlnite sînt bovideele, suideele, bufalinele, ovinele, caprinele, unele rozătoare etc.

Bovinele se pot infecta cu oricare din speciile de *Brucella*, însă *Br. abortus* le infectează cel mai mult. Infecția rămîne inaparentă, însă germenii persistă multă vreme în organism. O sensibilitate specială o posedă bovinele adulte gestante. Boala se manifestă prin avort, datorit exacerbării virulenței germenilor în timpul gestației și localizării lor în uter, unde produc o inflamație a mucoasei și corionului, urmate de pătrunderea lor în făt, pe care îl omoară. Avortul se produce, de obicei, între a 5-a și a 8-a lună de gestație. După avort sau fătare, germenii se localizează în mamelă, animalele putînd deveni excretoare de lungă durată. Infecția bruceloasă la tauri se manifestă prin orhită.

Suidecle sînt foarte susceptibile la infecția bruceloasă. Cu toate că *Br. suis* este mai totdeauna cauza infecției bruceloase la porci, au fost întîlnite la aceste animale și *Br. melitensis* și *Br. abortus* (Tarasov, Koslovski).

Cel mai caracteristic simptom al infecției bruceloase la suidee este tot avortul. După Pop, indicele de infecție în efectivele de suidee contaminate este de 97%, cu 87% avorturi, celelalte simptome însoțitoare ca febră, metrite și abcese în diferite regiuni ale organismului fiind des întîlnite.

Ovinele și caprinele sînt infectate mai totdeauna cu *Br. melitensis*. Și la aceste animale se observă avortul ca simptom predominant.

În Argentina a fost semnalată infecția bruceloasă spontană și la cobai, iar în țara noastră Tudoriu și colaboratorii (1955) au găsit iepuri sălbatici infectați cu *Br.suis*.

Infecția experimentală. Cele mai sensibile animale de laborator la infecția bruceloasă sînt cobaiul și hamsterul. La cobai, boala poate fi transmisă pe toate căile, inclusiv prin pielea epilată. Merionul, șobolanul și șoarecele alb sînt mai puțin sensibili.

În raport cu numărul, virulența și specia de germen din grupul *Brucella* se poate asista la cobai la aspecte variate de boală. Astfel, cu o tulpină virulentă și în cantitate convenabilă, simptomele înregistrate sînt: febră neregulată, pierdere în greutate pînă la cașexie, leziuni osoase și articulare (periostite, osteite, artrite și periartrite), leziuni ale aparatului genital (orhite și epididimite), leziuni ale aparatului respirator (pneumonii și bronhopeneumonii), leziuni nervoase cu pareze și paralizia trenului posterior.

Mecanismul infecției bruceloase experimentale se apropie mult de acela al infecției tuberculoase. Există o fază de latență de la infectare și pînă la invadarea ganglionilor regionali, a cărei durată este legată de virulența și numărul germenilor inoculați și care, în general, este scurtă. Urmează apoi o fază în care germenii se multiplică activ în celulele reticulo-histiocitare, parazitismul intracelular fiind una din caracteristicele acestor germeni. Dacă germenii sînt virulenți, trec în curentul limfatic și sanguin, ducînd la generalizarea infecției, care constituie ultima fază a bolii. În această fază, brucelele sînt diseminate în tot organismul, cantonîndu-se cu predilecție în sistemul reticulo-endotelial și în celulele parenchimatoase ale organelor.

La cobai este admisă părerea că infecția bruceloasă merge spre vindecare după 4—5 luni, cu leziuni de scleroză în organe; însă Versilova, cercetînd prin organo-culturi persistența *Br. melitensis* la cobaii infectați, deși constată o scădere importantă cu trecerea timpului, durata de vindecare nu este așa de scurtă; pe cînd în perioada 1—3 și jumătate luni, organo-culturile erau pozitive în 100% din cazuri, ele au fost pozitive în 17% și după 21—26 luni. Cele mai evidente leziuni macroscopice se constată după 30—60 de zile de la infectare; ele constau din splenomegalie, uneori cu abcese (splina depășește de 3—4 ori greutatea normală), precum și abcese în ficat, plămîn, testicul etc. Intensitatea acestor leziuni este în funcție și de specia de *Brucella* folosită.

Leziunea caracteristică a infecției bruceloase este „granulomul brucelos”, descris de Ajello. Granulomul tipic este format din celule epitelioide așezate în centru și înconjurate de elemente limfocitare și plasmatice, precum și eozinofile. Rareori se pot vedea și celule gigante, de tip Langhans.

Zdrodowski a scos în evidență prezența granulomului brucelos în peretele vascular și evoluția lui precoce spre fibrozare, arătînd totodată însemnătatea acestuia în afecțiunile vasculare.

Bonciu, Dimitriu, Vasilescu și Cerbu au putut pune în evidență granuloame bruceloase la cobai cu organo-culturi negative.

Imunitate. Nu se poate vorbi de o imunitate naturală în infecția bruceloasă, deși există la om și animale un oarecare grad de rezistență legată de puterea bactericidă a serului și a fagocitozei. Pe de altă parte este greu de apreciat la om imunitatea activă care, eventual, s-ar instala prin trecerea prin boală, fie din cauza caracterului ciclic și cronic al infecției, fie din cauză că infecția bruceloasă, fiind deseori o boală profesională este greu de precizat cînd se termină infecția primară și cînd se produc reinfecțiile. Imunitatea postinfecțioasă, chiar dacă ar avea loc, se pare că este de scurtă durată, fiindcă unele cazuri considerate vindecate din punct de vedere clinic și bacteriologic, s-au reinfectat după 2 ani. Cercetările referitoare la imunitatea animalelor infectate au întregit cunoștințele noastre asupra acestei probleme. Se cunoaște azi că imunitatea cobailor, după infecție, se dezvoltă lent și că, după doi ani de la vindecare, devin receptivi la o nouă infecție (Kelly și Gorelick). Se știe, de asemenea, că vaccinurile preparate cu germeni omorîți sau cu extracte microbiene adsorbite pe suport mineral, deși oferă cobailor și caprelor o rezistență mai mare față de infecția specifică, se pot obține organoculturi pozitive după două luni de la inocularea de probă a animalelor vaccinate (Renoux).

În fine, folosirea vaccinurilor vii cu germeni atenuați (variantă cunoscută sub numele de B_{19}) a îngăduit lui Zdrodowski și Versilova să obțină o imunitate dobîndită contra infecției cu *Br. melitensis*. Pe de altă parte, Bonciu, Dimitriu, Vasilescu și Cerbu, cercetînd mecanismul imunității în bruceloză pe criterii histopatologice, au constatat că animalele vaccinate cu germeni atenuați (tulpina B_{19}) au prezentat la infecția de probă leziuni histologice în organe numai în proporție de 17%; aceasta demonstrează în același timp valoarea imunizantă a vaccinului preparat cu această tulpină, ca și alte aspecte ale imunității specifice legate de reinfecția bruceloasă.

Reactivitatea imunologică față de infecția bruceloasă, apreciată prin dinamica anticorpilor specifici, se însoțește și de o reactivitate alergică.

În infecția experimentală, reactivitatea imunologică și alergică a fost studiată de numeroși autori ca Burnet, Zdrodovski și Striter etc., iar în țara noastră de către Dimitriu, Vasilescu și Cerbu. Cu această ocazie s-a putut stabili că modificările reactivității sînt în funcție de specia și tulpina de brucelă folosită, de virulența ei, de numărul germenilor inoculați și calea de administrare etc. În doze mari, reacția alergică, anticorpii aglutinanți și opsonizanți sînt bine dezvoltați încă din primele zile de la infecție, se mențin ridicați în primul an, curbele reacției opsonofagocitare și ale reacției alergice menținîndu-se pozitive un timp și după autosterilizare (1—2 ani). Apariția anticorpilor blocanți și titrul lor întrec de obicei valorile aglutininelor, iar apariția, titrul și durata anticorpilor fixatori de complement sînt legate mai ales de virulența tulpinii infectante.

După Dimitriu și colaboratorii apariția, valorile și durata anticorpilor sînt în strînsă legătură cu starea de integritate a sistemului reticuloendotelial și a sistemului nervos central.

Tratamentul specific. Datorită parazitismului intracelular caracteristic infecției bruceloase, ca și patogeniei sale particulare, legată de fazele sale evolutive, tratamentul acestei infecții este complex și individualizat. Printre substanțele folosite, în afară de antibiotice ca aureomicina și teramicina, care, asociate cu cortizon și ACTH, au dat cele mai bune rezultate, o serie de alte substanțe ca piloselina (extrasă din *Hieracium pilosella*) și garlicina (extrasă din *Alium sativum*), puternic active *in vitro* asupra celor 3 specii de *Brucella*, sînt de încercat.

Vaccinurile omorîte sînt deseori folosite cu scopul de a stimula fagocitoza și sistemul reticulo-endotelial.

Aplicarea vaccinului se poate face pe cale intradermică în cazurile de bruceloză cronică ambulatorie, sau pe cale intravenoasă în formele cronice subfebrile. Prima inoculare se va face cu o cantitate de germeni egală cu aceea care a dat o slabă reacție locală la testarea sensibilizării bolnavului pe cale intradermică și care poate fi de ordinul milioanelor sau mai puțin. Dozele următoare de vaccin se măresc progresiv în raport cu starea generală a bolnavilor, 7—8 inoculări constituind o cură. Pot fi folosite, repetat, mai multe asemenea cure. După unii autori (Pandikov, Rudnev etc.), acest mijloc de tratament a dus la ameliorarea și chiar sterilizarea infecției bruceloase.

Diagnosticul de laborator

Ținînd seamă că polimorfismul clinic așa de accentuat al infecției bruceloase nu îngăduie totdeauna punerea diagnosticului, rămîn numai probele de laborator să confirme existența infecției.

Diagnosticul de laborator al infecției bruceloase este constituit din:

A. Diagnosticul bacteriologic care se rezumă la punerea în evidență a germenului cauzal în produsele patologice.

B. Diagnosticul serologic, în care se pun în evidență modificările umorale specifice sau ale reactivității bolnavului, față de antigenul corespunzător.

C. Diagnosticul prin intradermoreacție.

A. **Diagnosticul bacteriologic.** Se bazează pe izolarea și identificarea germenilor din produse patologice diverse ca: sînge (venos sau arterial), măduva oaselor, ganglioni limfatici, placente de avorton, piese chirurgicale sau de necropsie, fecale, urină, bilă și alte lichide organice (revărsate pleurale, articulare) etc. Ca și în alte infecții, numai izolarea și identificarea germenului cauzal constituie diagnosticul de certitudine al infecției bruceloase.

1. *Bacterioscopia produselor patologice.* Din cauza sărăciei germenilor în aceste produse, bacterioscopia oferă

rar ocazia de a pune în evidenţă germeni cu morfologia şi caracteristicile tinctoriale ale brucelelor.

Microscopia cu fluorescenţă pare să fie promiţătoare (Moody şi colab. 1961).

2. *Izolarea directă a brucelelor* se obţine de obicei greu, germenii putînd fi izolaţi mai cu uşurinţă în formele acute şi subacute cu stadii bacteriemice prelungite de boală. Metodele cele mai potrivite sînt hemocultura, adenocultura, medulocultura, precum şi cercetarea germenilor în urină, fecale, bilă, lapte.

Hemocultura oferă cele mai ridicate procente de pozitivitate. Sîngele în cantitate de 5–10 ml este însămînţat pe un mediu de cultură adecvat care se incubează la 37° şi se urmăreşte timp de 30–45 de zile.

Adenocultura se practică prin puncţie sau cu ajutorul unui ganglion limfatic, obţinut prin biopsie; după Janbon, adenocultura este superioară chiar hemoculturii. Medulocultura introdusă ca metodă de izolare de Barbagallo oferă uneori rezultate pozitive chiar în cazuri vindecate clinic.

Urina recoltată aseptic se centrifughează energic şi se însămînţează sedimentul. Fecalele suspensionate în ser fiziologic sînt filtrate prin tifon şi tratate cu ser aglutinant, astfel ca să obţinem o diluţie finală de 1%. Ulterior sînt menţinute 2 ore la 37° şi se centrifughează; sedimentul reluat în ser fiziologic se însămînţează pe medii selective.

Bila dă rezultate pozitive ridicate, în colecistitele bruceloase.

Laptele este cercetat pentru punerea în evidenţă a germenilor, în special, în medicina veterinară.

Mediile folosite pentru însămînţarea produselor de mai sus sînt următoarele:

a) Bulion glucozat 1%.

b) Mediul recomandat de Pop, pentru efectuarea hemoculturilor, preparat după principiul metodei Castaneda: macerat de carne, 100 ml; peptonă, 2 g; citrat de sodiu, 4 g; glucoză, 1 g; clorură de sodiu, 0,5 g.

Se ajustează la pH 7,2. Se sterilizează 30 de minute la 110°. Apoi se prepară următorul mediu: macerat de carne, 100 ml; peptonă, 2 g; glucoză, 1 g; citrat de sodiu, 0,5 g; clorură de sodiu, 0,5 g; geloză 3 g.

Se ajustează la pH 7,2. Se sterilizează 30 de minute la 110°.

Se repartizează într-un flacon Erlenmeyer (capacitate 100–150 ml) 4–5 ml mediu gelozat; se înclină flaconul şi se lasă să se întărească înclinat pe un perete al flaconului. Se repartizează apoi cîte 5 ml bulion citratat steril. Se controlează sterilitatea mediului 24–48 de ore după incubare la 37°.

c) Mediul Kuzdas şi Morse (denumit şi mediul W): la 1 000 ml geloză glicerinată 2% şi glucozată 1%, pH=6,8–7, se adaugă cristal-violet 1,4 mg. După Renoux se poate înlocui cristal-violetul prin violet de etil soluţie 1/800 000.

Se sterilizează 15 minute la 115°, se adaugă apoi: polimixină B 6 000 U; bacitracină, 25 000 U; circulină 15 000 U; actidion, 100 mg.

d) Mediul Mair: la 1 000 ml geloză preparată cu macerat de inimă de bou, la pH 6,8 se adaugă steril: sînge de cal, 50 ml; violet de genţiana 0,4%, 1 ml; polimixină B (sulfat), 6000 U; penicilină, 5 000 U; actidion 100 mg.

Adăugarea substanţelor colorante şi a antibioticelor la mediile descrise de la punctele *c* şi *d* împiedică dezvoltarea florei de contaminare, permiţînd în acelaşi timp dezvoltarea brucelelor.

Izolarea brucelelor se face şi prin probe biologice :

Inocularea la cobai. Din produsele biologice suspecte se inoculează pe cale subcutanată 2 cobai cu cîte 1 ml. Cobaii sînt urmăriţi 60 de zile, sub aspectul pierderii greutăţii şi al febrei.

Începînd de la a 10-a zi, cobaii sînt sîngeraţi şi se cercetează apariţia anticorpilor anti-*Brucella* ; la 45—60 de zile se testează apariţia alergiei bruceloase cu ajutorul metodei intradermoreacţiei Burnet (0,1 ml brucelină injectată strict intradermic). În caz că reacţia este pozitivă, apare la locul de inoculare un eritem însoţit de edem în mărime de 1×1,5 cm.

Către a 60-a zi, cobaii sînt sacrificaţi şi se practică organo-culturi. Se examinează de asemenea macro- şi microscopic : locul de inoculare, ganglionii limfatici şi organele. În caz de organo-culturi pozitive, germenii sînt identificaţi după procedeele obişnuite.

Ovocultura. Se folosesc ouă embrionate de 5 zile care sînt inoculate în sacul vitelin cu sînge sau produse patologice, necontaminate secundar. În eventualitatea prezenţei germenilor din grupul *Brucella* pot apărea rezultate pozitive în 120 de ore de la inoculare. După deschiderea aseptică a ouălor şi triturarea embrionului se fac însămînţări pe mediile adecvate, culturile pozitive identificîndu-se din punct de vedere morfologic şi al caracterelor de cultură, biochimice şi serologice.

3. *Identificarea germenilor din genul Brucella.* Germenii izolaţi în cultură pură sînt identificaţi după caracterele morfologice şi serologice. Determinarea serologică se efectuează cu ajutorul unui ser aglutinant anti-*Brucella*, pus în contact cu germenul izolat, în formă „S", fie folosind aglutinarea pe lamă, fie aglutinarea în tub.

Pentru a se stabili cărei specii de *Brucella* aparţin germenii izolaţi, se efectuează o serie de probe de laborator, după cum urmează :

a) Necesitatea CO_2 : tulpinile de *Br. abortus* cer la izolare şi primele subculturi o atmosferă cu CO_2, 10%.

b) Producerea de H_2S : tuburile cu culturi de *Brucella*, pe geloză înclinată cu pH 6,6 sînt prevăzute cu hîrtie înmuiată în soluţie 10% de acetat de plumb. La fiecare 24 de ore, hîrtia este înlocuită cu o alta şi se măsoară timp de 8 zile zona înnegrită de sulfură de plumb.

Br. suis degajă H_2S în cantitate mare (10—12 mm, timp de 6—7 zile).
Br. abortus degajă în cantitate mijlocie (4—5 mm timp de 2—4 zile).
Br. melitensis degajă în cantitate mică (slab, timp de 24 ore).

c) Testul bacteriostatic prin coloranţi (Huddleson) : coloranţii de anilină posedă capacitatea de a inhiba diferenţial dezvoltarea speciilor de *Brucella*. Pentru aceasta, ei sînt adăugaţi în anumite concentraţii în mediul de cultură. Mediile folosite pot fi gelozaficat sau geloza glicerinată 2%, la pH 6,6.

Sînt folosiţi coloranţii : fucsina bazică, în concentraţia 1/25 000 şi tionina 1/50 000. Concentraţiile indicate sînt valabile numai dacă se întrebuinţează coloranţii standard furnizaţi de „National Aniline and Chemical Co. Inc. N.Y.". În lipsă, concentraţiile de coloranţi, de altă provenienţă terbuie stabilite în prealabil faţă de tulpinile standard de referinţă.

Mediile astfel preparate sînt turnate în plăci Petri, care după răcire, sînt însămînțate cu ansa dintr-o suspensie groasă (3 miliarde/ml). Culturile sînt incubate 3 zile la 37°, după care se citesc. Întotdeauna sînt însămînțate pentru a servi ca martor și tulpinile standard de referință.

Tabelul LXIV

Modul de comportare față de coloranți al tulpinilor de Brucella

Coloranți	*Br. melitensis*	*Br. abortus*	*Br. suis*	*Br. ovis*
Fucsină bazică	+	+	−	+ −
Tionină	+	−	+	+

Legendă: + = cultivă
− = nu cultivă
+ − = variabil

d) Testul bacteriostatic prin ovalbumină. Ovalbumina are proprietatea de a inhiba dezvoltarea *Br. abortus.*

Mediile folosite pentru efectuarea acestui test sînt:

— Mediul Bruschetinni format din: albuș de ouă, 0,5 ml; lapte degresat sterilizat, 0,5 ml; geloză-ficat topită și răcită la 45°, 5 ml.

La prepararea lor nu trebuie să se depășească temperatura de 80°.

e) Mediul Petragnani, cu și fără verde malahit, diferențiază speciile de *Brucella*, după cum se vede în tabelul LXV.

Tabelul LXV

Specia de *Brucella*	Cu verde malahit	Fără verde malahit
Br. melitensis	+	+
Br. abortus	−	−
Br. suis	−	+

f) Testul cu dietilditiocarbamat de sodiu (DEDTC). Testul a fost propus de Renoux; efectuarea lui se face astfel: se însămînțează pe agar într-o cutie Petri o suspensie groasă dintr-o cultură de 48 de ore a tulpinii de *Brucella* supusă testului; se înlătură excesul de cultură și se menține placa la termostat pînă ce suprafața agarului este uscată.

Se depune în centrul plăcii un disc steril de hîrtie de filtru, cu un diametru de 11 mm, îmbibat într-o soluție proaspătă de DEDTC 1%. Ulterior, placa este examinată pe fond negru pentru a se pune în evidență zona de inhibiție din jurul discului.

Sub influența acestei substanțe se observă în jurul discului o zonă omogenă de cultură, de intensitate slabă, urmată de o zonă de inhibiție de 3—4 mm, cînd cultura aparţine *Br. melitensis*; de o zonă formată din 2 inele — unul intens castaniu şi altul alb — separate de o zonă clară, foarte subţire, cînd cultura aparţine *Br. abortus* şi o zonă de inhibiţie clară, cu diametrul de 2—3 cm, cînd cultura aparţine *Br. suis*.

g) Testul ureazei: mediul folosit este cel descris de Fergusson-Hook, repartizat în tuburi de hemoliză sub volum de 1 ml şi însămînţat cu o picătură dintr-o suspensie de 3 miliarde germeni.

Reacţia se urmăreşte la temperatura laboratorului.

După Renoux, *Br. suis* hidrolizează ureea în timp de 1—3 minute; *Br. melitensis* în timp de 4—6 minute, iar *Br. abortus* în 8—60 de minute.

B. **Diagnosticul serologic.** Ţinînd seamă de evoluţia ciclică a brucelozei, cu remisiuni şi reactivări clinice alternante, diagnosticul serologic nu se efectuează niciodată printr-o singură metodă serologică, ci numai prin asocierea, dacă este posibil, a tuturor metodelor cunoscute. Printre metodele serologice folosite se enumeră:

1. *Reacţia de aglutinare.* Acestă reacţie poate fi efectuată după procedeul Wright (aglutinarea în tuburi) sau procedeul Huddleson (aglutinare rapidă pe lamă).

a) Procedeul Wright: foloseşte ca antigen o suspensie de *Brucella*, inactivată prin formol 0,5% cu densitatea 10 miliarde germeni pe ml. În momentul efectuării reacţiei, antigenul este diluat 1/10 cu ser fiziologic 9‰. Serul bolnavului trebuie să fie proaspăt, limpede şi nehemolitic. Reacţia se efectuează după tabelul LXVI.

Tabelul LXVI

Schema seroreacţiei după procedeul Wright

Tuburile	1	2	3	4	5	6	7	8	Martori	
Ser fiziologic (ml)	0,92	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,92
Ser de la bolnav (ml)	0,08	se fac treceri din tub în tub cîte 0,5 ml							—	0,08
Diluţia serului de la bolnav	1/12,5	1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	—	—
Antigen (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	—
Diluţia finală	1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	—	—

Tuburile sînt lăsate 24 de ore la 37° şi 2 ore la temperatura camerei. Rezultatele se citesc cu ochiul liber. Titrul aglutinant 1/100 (++) sau 1/50 (+++), comparat cu tubul martor, la persoane cu simptome clinice de bruceloză, este un titru de diagnostic. Cum acest titru poate fi întîlnit şi la persoane care au consumat vreme îndelungată produse contaminate de brucele, dar sterilizate, urmărirea reacţiei în dinamică este indicată.

O reacţie Wright negativă nu exclude prezenţa aglutininelor specifice; ea poate fi rezultatul prezenţei anticorpilor blocanţi, care împiedică aglutinarea. Pentru a elua anticorpii blocanţi de pe substratul bacterian (antigen) se foloseşte în reacţie, ca diluent al serului şi antigenului, soluţia de NaCl 10%.

Anticorpii blocanți mai pot fi puși în evidență și prin procedeul Wiener-Race-Griffith, așa-numitul „blocking-test". Principiul reacției este următorul: cînd toți receptorii antigenici sînt saturați de un anticorp incomplet, aglutinarea consecutivă cu un anticorp complet nu se mai produce. Această reacție se efectuează astfel: se adaugă o picătură dintr-un ser aglutinant anti-*Brucella* obținut pe animale de laborator, în fiecare tub al unei reacții Wright negative. Se incubează la 37°, timp de 24 de ore. Dacă de această dată se produce fenomenul de aglutinare, serul bolnavului nu conține nici aglutinine anti-*Brucella*, nici anticorpi blocanți. Dacă aglutinarea nu se produce, serul conține anticorpi blocanți, care, învăluind corpii germenilor bruceloși, împiedică punerea în contact a acestor germeni cu anticorpii în serul aglutinant, ulterior adăugat.

O altă metodă pentru detectarea și titrarea anticorpilor blocanți antibruceloși este metoda Coombs sau testul antiglobulinic.

Principiul metodei este următorul: serul antiglobulinic uman se combină cu anticorpul blocant care este de natură globulinică și care este fixat în strat monomolecular pe germeni (antigen).

Desfășurarea metodei este următoarea:

Se centrifughează 15 minute la 3 000 t/min. în tuburile (sau numai ultimele) în care s-a efectuat reacția Wright și care s-a dovedit negativă. Se îndepărtează supernatantul, iar sedimentul este resuspendat într-un volum mare de ser fiziologic. Se centrifughează. Se fac trei asemenea spălări ale sedimentului. După ultima spălare, sedimentul se resuspendă în 1 ml ser fiziologic. În fiecare tub de reacție se adaugă o picătură dintr-un ser antiglobulinic uman cu titru 1/4 000. (În acest caz, picătura adăugată reprezintă în tubul de reacție titrul 1/100.) Tuburile, bine agitate, se incubează, la 37°, timp de 2 ore, și se lasă la ghețar pînă a doua zi. Citirea se face în felul cum se citește o hemaglutinare (depozit compact, perfect rotund, reacție negativă; depozit crenelat, neregulat și răspîndit pe suprafața fundului tubului, reacție pozitivă). O reacție pozitivă arată prezența anticorpilor blocanți. Titrul anticorpilor blocanți este apreciat prin ultima diluție de ser de bolnav care dă o reacție pozitivă.

b) Procedeul Huddleson-Kaimațova: acest procedeu este rapid, elimină fenomenul de zonă datorit anticorpilor blocanți, antigenul fiind colorat, aglutinarea este mai aparentă, iar cantitățile de ser și antigen folosite în reacție sînt mici.

Antigenul este o suspensie de *Brucella*, omorîtă, colorată, titrată față de diverse diluții de ser aglutinant anti-*Brucella*.

Pentru efectuarea reacției se procedează în felul următor: pe o placă de sticlă se depun la diferite intervale, sub forma unor picături, cantități descrescînde de ser proaspăt de la bolnav, iar alături de fiecare picătură de ser o cantitate fixă de antigen colorat. Se amestecă ambele picături cu colțul unei lame avînd grija de a porni de la diluția cea mai mare de ser, către concentrația cea mai puternică. Se încălzește ușor lama (37°), timp de 1—2 minute, cu ajutorul unei flăcări sau al unui dispozitiv special și se face citirea rezultatelor. O reacție pozitivă este pusă în evidență prin apariția de aglutinate colorate care plutesc în lichidul devenit clar al amestecului.

c) Reacția inelară în lapte: această reacție se practică pe laptele proaspăt, crud, în vederea punerii în evidență în acest aliment a anticorpilor aglutinanți antibruceloși.

Antigenul folosit este o suspensie densă de brucele, colorate vital cu trifeniltetrazoliu, substanță incoloră, care, sub acțiunea ureazei, prezentă în corpul brucelelor, este transformată în formazan de culoare roșie. Antigenul este inactivat cu ajutorul mertiolatului de sodiu 1/5 000.

Tehnica reacției este următoarea : 1 ml lapte cu o picătură de antigen colorat sînt amestecate într-un tub. Tubul se agită și se lasă 1—2 ore la temperatura laboratorului sau 30 de minute la 37°.

În eventualitatea unei reacții pozitive, ridicarea smîntînei la suprafață este însoțită de un inel de culoare roșie, restul laptelui rămînînd decolorat. Tubul martor rămîne colorat în roz, iar inelul de smîntînă rămîne alb.

Metoda este folosită curent în medicina veterinară pentru detectarea brucelozei bovine, în special în laptele de amestec.

2. *Reacția de fixare a complementului.* Pune în evidență sensibilizinele bruceloase care se întîlnesc în serul bolnavilor cu forme acute și subacute de boală.

Antigenul folosit în reacție este antigenul întrebuințat în reacția Wright. Tehnica este similară celei descrise pentru seroreacția Bordet-Wassermann.

3. *Reacția opsono-citofagică.* Pune în evidență activitatea opsoninelor prezente în serul bolnavilor de bruceloză. Reacția este cunoscută și sub numele de indicele opsono-citofagic (I.O.C.).

Antigenul folosit în reacție este o suspensie de *Brucella* în forma „S”, inactivată 45 de minute la 70°.

Se amestecă într-un tub de hemoliză 0,25 ml din soluția citrat de sodiu 2% cu 0,25 ml antigen brucelos și 0,5 ml sînge de bolnav, recoltat pe loc.

Se lasă amestecul 20 de minute la 37°, agitîndu-se din cînd în cînd, după care se fac frotiuri care se colorează cu metoda May-Grünwald-Giemsa.

Citirea se face numărînd germenii fagocitați de 25 polimorfonucleare (vezi tabelul LXVII).

Tabelul LXVII

Numărul germenilor fagocitați într-un leucocit	Simbolul de apreciere al fagocitozei	Numărul de polinucleare examinate	Calcularea I.O.C.
0	0	2	2 × 0 = 0
1—20	+	4	4 × 1 = 4
21—40	++	6	6 × 2 = 12
41 și mai mult	+++	13	13 × 3 = 39

Rezultat : I.O.C. = 55

Indicele maxim este 75. Acest indice este atins, cînd cele 25 polimorfonucleare examinate au fagocitat toate peste 40 de germeni (25×3=75).

După indicii obținuți, aprecierea reacției opsono-fagocitare este după Huddleson următoarea :

Un indice	0	este	socotit	negativ
,,	,, 1—20	,,	,,	slab pozitiv
,,	,, 21—40	,,	,,	pozitiv
,,	,, 41—75	,,	,,	intens pozitiv

Reacția opsono-citofagică prezintă și o valoare prognostică. Astfel, indicii cuprinși între 1 și 20 presupun o susceptibilitate la infecția bruceloasă ; indicii cuprinși între 25 și 49 presupun o infecție, dacă mai există și alte reacții specifice pozitive și, în fine, indicii cuprinși între 50 și 75 presupun o bună apărare a omului examinat.

C. Diagnosticul prin intradermoreacție. Infecția bruceloasă este una din bolile alergizante. Alergia bruceloasă apare în cursul infecției, mai devreme sau mai tîrziu, în raport cu masivitatea infecției, virulența tulpinii infectante și calea de pătrundere în organism.

Diagnosticul alergic al brucelozei se efectuează cu un alergen, denumit brucelină, utilizat pentru prima oară în 1922 de către Burnet sub numele de melitină. Brucelina este filtratul unei culturi în bulion de *Brucella* în faza „S”, veche de 25 de zile. După Burnet, această substanță nu este antigenică și nu sensibilizează organismul. Injectată strict intradermic, sub volum de 0,1 ml, brucelina produce la locul de inoculare, la persoanele alergizate, o reacție foarte evidentă după 48 de ore de la inoculare, caracterizată prin eritem și edem de formă ovală, dureros.

Intensitatea reacției se notează cu :

++++	edemul cu diametrul 6—8 cm, însoțit de ascensiuni febrile, curbatură, cefalee, dureri articulare, iar local uneori apariția de necroză ;
+++	edemul cu diametrul 4—6 cm ;
++	edemul cu diametrul 3—4 cm ;
+	edemul cu diametrul 1—2 cm.

Reacția cu brucelină este specifică ; ea este negativă la indivizii sănătoși și un revelator activ al alergiei bruceloase. După Castañeda, o intradermoreacție pozitivă de intensitate mare, poate fi unicul semn de boală cronică, iar Ithurrat și colaboratorii socotesc valabilă pentru diagnosticul brucelozei cronice chiar o probă de intensitate medie.

În afară de brucelină au mai fost preparate și alergene purificate ca : brucelogenul Huddleson, hidrolizatul Ottosen-Plum, brucelhidrolizatul Kotlearova etc.

Interpretarea diagnosticului serologic și alergic al brucelozei trebuie judicios făcută :

1. O probă I.O.C. negativă, însoțită de o reacție de aglutinare negativă și o intradermoreacție Burnet negativă se întîlnesc la indivizi neinfectați.

2. O pobă I.O.C. negativă sau slab pozitivă însoțită de oricare altă probă serologică pozitivă arată o slabă apărare la infecția bruceloasă.

3. O probă I.O.C. intens pozitivă, însoțită de o reacție de aglutinare și o reacție de fixare, slab pozitivă, arată un grad de imunitate (apărare bună).

Epidemiologie

Infecția bruceloasă cunoaște surse foarte numeroase; ea este foarte răspîndită la rozătoare (iepuri, popîndăi, șobolani, șoareci), la păsări, animale mari (bovidee, ovine, caprine, etc.), căpușe (*Dermacentor marginatus* și *Argaside*), țînțari, ploșnițe, muște etc. Pe de altă parte, brucelele au o rezistență apreciabilă și în mediu (apa de robinet 77 de zile, pămînt cu materii organice 91 de zile, lapte și smîntînă 40 de zile etc.).

Bruceloza umană poate fi contractată pe orice cale: digestivă, aeriană, cutanată etc., ca și prin contact. Contaminarea directă, după unii autori, pare mai frecventă decît contaminarea alimentară (boală profesională). Alimente mai des infectate sînt: laptele, smîntîna, brînzeturile etc. Contaminarea prin alimente poate atinge 75% din totalul îmbolnăvirilor (Kling). Sînt și înbolnăviri de laborator datorite contaminării în momentul manipulării materialului infectant, precum și autopsierii animalelor în experiență. După Castañeda, nici un cercetător din laboratoarele care studiază bruceloza nu scapă de această infecție.

Profilaxia brucelozei este strîns legată de eradicarea brucelozei animale.

Acestea se realizează prin cercetarea incidenței bruceloase la animale, instituirea de norme profilactice (ferme de izolare a animalelor bruceloase și vaccinarea vitelor cu vaccinul viu atenuat B_{19}), aplicarea legilor speciale în vigoare și măsuri sanitare veterinare pentru distrugerea germenilor bruceloși în produsele animale (pasteurizarea laptelui etc.).

Imunoprofilaxia specifică omului a fost efectuată în U.R.S.S. (Zdrodowski) prin vaccinarea preventivă cu vaccinuri atenuate (tulpina de *Br. abortus* 19-BA).

Genul Bacillus

Conf. N. Pozsgi

Genul *Bacillus* cuprinde germeni în formă de bastonaşe, grupaţi în lanţuri sau izolaţi, gram-pozitivi, gram-negativi sau gram-variabili. Majoritatea sînt mobili, fiind prevăzuţi cu 4—12 cili peritrichi, alţii imobili (*B. anthracis*). Cresc pe medii obişnuite. Temperatura optimă şi cea maximă de creştere sînt variabile chiar în interiorul speciei. Aproape toţi aceşti germeni produc un ferment proteolitic (lichefiază gelatina), alţii produc o hemolizină (*B.cereus*). Multe specii elaborează substanţe cu acţiune antibiotică (*B. polymyxa*, *B. brevis* etc.); produc catalază; aerobi şi facultativ anaerobi; *Bacillus anthracis* este singurul patogen pentru animale şi om; ceilalţi reprezentanţi: *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. cereus*, *var. mycoides*, *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. brevis*, *B. circulans*, *B. pasteuri* etc. sînt saprofiţi şi au largă răspîndire în natură (sol, plante, alimente, fecale, praf).

Bacillus anthracis şi infecţia cărbunoasă

Istoric. A fost primul microb observat la animale, de Davaine şi Rayer, în 1850. Koch (1877) obţine culturi pure şi reproduce experimental boala. Pasteur, împreună cu colaboratorii săi, obţin pentru prima dată culturi cu virulenţă atenuată, punînd bazele experimentale şi ştiinţifice ale metodei de imunizare activă în profilaxia antiinfecţioasă.

La noi în ţară, Riegler, a făcut studii despre patogenia, biologia şi vaccinarea în antrax.

Morfologie. *Bacillus anthracis* are forma unui bastonaş de 3—10 µ lungime, 1—2 µ grosime, cu margini paralele, capetele retezate ori concave, apărînd în lanţuri ce imită trestia de bambus. Forma şi mărimea pot varia în funcţie de tulpină, mediu, vîrsta culturii. Este imobil, gram-pozitiv.

În corpul animal sau uman, bacilii se prezintă fie izolaţi, fie în lanţuri scurte, fiind totdeauna încapsulaţi. *In vitro*, în contact cu aerul atmosferic, în general se prezintă fără capsulă, dar pot să-şi dezvolte o capsulă pe un mediu bogat în proteine animale: plasmă, ser, sînge şi într-o atmosferă care conţine cel puţin 10% CO_2. Dezvoltarea este maximă în 6 ore.

În mediul exterior poate forma spori (pe medii de cultură, sol etc., cadavrele deschise ale animalelor). Forma vegetativă sporulează în contact cu oxigenul molecular din atmosferă; lipsa ionilor de calciu favorizează de asemenea sporulaţia. Temperatura optimă de sporulaţie este între 32° şi 35°.

Sporul de formă ovalară, cu o membrană foarte rezistentă, este aşezat central şi germinează polar. Sporul păstrează caracterele de virulenţă ale formei vegetative şi le transmite ereditar.

Corpul celular se colorează cu coloranţi obişnuiţi de anilină; cu soluţie apoasă fenolată de albastru de toluidină, citoplasma apare albastră, iar capsula în roz.

Caractere de cultură. Germen aerob, facultativ anaerob. Se dezvoltă pe medii uzuale de laborator, cu optimum de temperatură 35°—36°. Înmulţirea se opreşte sub 14° şi peste 43°. Prin cultivare continuă poate fi adaptat la temperaturi mai joase sau mai înalte; pH optim al mediului este 7,0—7,4.

Pe geloză şi gelatină se dezvoltă în colonii de tip ,,,R'', mari, 2-3 mm diametru, albe-cenuşii, opace, cu suprafaţa rugoasă, membranoase, uscate, aderente de mediu, cu margini neregulate, cu prelungiri laterale, formate din lanţuri paralele de bacili, luînd aspectul unor bucle de păr (cap de meduză). Coloniile ,,R'' sînt virulente, cu capacitatea de formare a capsulei păstrată (inoculate la animale de experienţă produc capsulă).

Alături de coloniile tipice apar uneori în culturile mai vechi de laborator sau în urma transferului în serie, mai ales la temperatură ridicată (coloniile tulpinilor vaccinului atenuat Pasteur) pe agar şi gelatină, colonii izolate, netede, cu contururi regulate (rotunde), lucioase ,,S''.

Într-o atmosferă cu CO_2 pe agar sau sînge se dezvoltă colonii rotunde, lucioase cu bacili capsulaţi de tipul coloniilor ,,M'' mucoide. În laborator se pot observa uneori în culturi vechi colonii mucoase descrise altădată de Preisz (1911). De asemenea se pot obţine variante acapsulate şi edematogene prin cultivarea bacteridiei cărbunoase în sînge defibrinat de cal (Sterne şi Stamatin); formează colonii ,,R'', în orice condiţie de cultură, deoarece şi-au pierdut capacitatea de sinteză a polipeptidului capsular.

În bulion, varianta ,,R'' formează un depozit floconos, tulburînd puţin sau de loc mediul; culturile ,,S'' rotunde dau o creştere difuză, tulburînd uniform bulionul.

Laptele este coagulat şi apoi peptonizat; gelatina dreaptă după 2-3 zile este lichefiată în formă de brad inversat.

Pe cartofi creşte o cultură abundentă albă-cenuşie.

Pe medii solide cu sînge (oaie, om, iepure), de obicei *B. anthracis* nu produce hemoliză; unele tulpini provoacă însă o zonă redusă de hemoliză. Bacilii aerobi saprofiţi produc o hemoliză intensă.

Bacilul cărbunelui se dezvoltă pe un mediu sintetic conţinînd glucoză, aminoacizi, cistină, metionină, triptofan, dextroză şi săruri minerale. Tiamina este considerată ca singura vitamină necesară.

Caractere biochimice şi de metabolism. Fermentează, fără formare de gaz, glucoza, trehaloza, fructoza, zaharoza, maltoza.

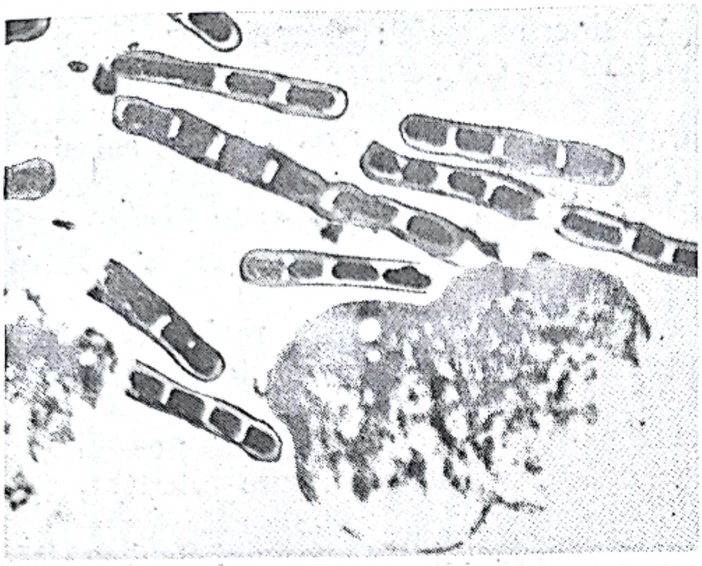


Fig. 127. — *B. anthracis* — frotiu din splină de șoarece infectat experimental (× 900).

V-P +

Hidrolizează amidonul. Produce acetilmetilcarbinol, amoniac, lecitinază, catalază, protează, amilază, colagenază, transaminază. Reduce nitrații în nitriți și albastrul de metilen din lapte.

Rezistența la agenții fizici, chimici și biologici. Formele vegetative sînt distruse la 55°, în 15—30 de minute.

Sporii sînt mult mai rezistenți la acțiunea diferiților agenți. În stare uscată se pot păstra în condiții de viață mulți ani. Temperatura de fierbere a apei îi distruge în 10 minute. Prin autoclavare la 120° sînt omorîți instantaneu; sterilizarea se face în mod obișnuit, timp de 15—20 de minute. Sub acțiunea căldurii uscate, sporii rezistă foarte multă vreme la 140°, distrugîndu-se după 3 ore. Temperatura joasă nu influențează metabolismul lor; la —5° pînă la —10°, sporii nu-și pierd vitalitatea nici după 10 ani.

Tulpinile sporogene menținute pe medii solide în epubete închise își păstrează ani îndelungați proprietățile de cultură și de patogenitate.

Razele solare directe îi distrug în decurs de 6—12 ore.

Agenții chimici distrug repede formele vegetative, însă sporii rezistă mai mult. 5% fenol omoară sporii în 2 zile; sublimatul corosiv, în 40 de minute; formolul 1—2%, în cîteva minute; clorura de var 5% și hidratul de sodiu 5% îi omoară de asemenea în cîteva minute.

În produsele animale sporii se distrug mult mai greu; sărarea cărnii nu-i afectează, nici tăbăcirea pielii cu tananți.

Părul de cal, lîna și alte produse se introduc în formol 1—3% sau se sterilizează cu vapori de formol amestecați cu vapori de apă, la presiune înaltă.

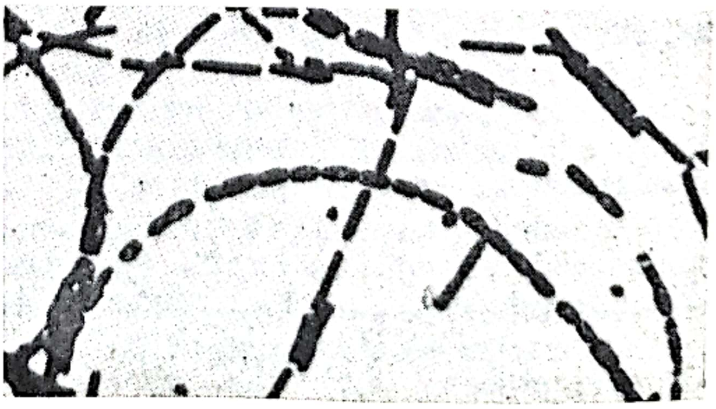
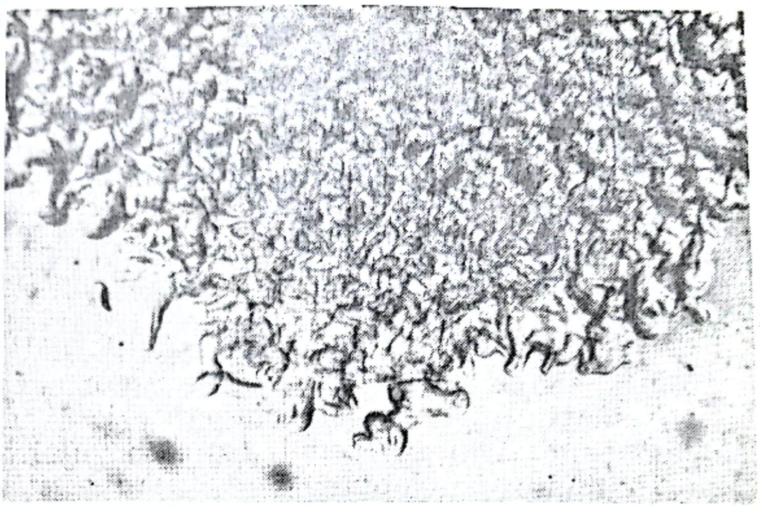


Fig. 128. — *B. anthracis,* cultură de 48 de ore în bulion, cu spori (×900).

Fig. 129. — *B. anthracis*, colonii pe agar, după 48 de ore (× 20).



Bacilii cărbunoşi sînt sensibili la acţiunea sulfamidelor şi a antibioticelor (penicilină, tetraciclină, streptomicină, cloramfenicol).

Sînt deosebit de sensibili la acţiunea antagonismului microbian; în cadavrele nedeschise dispar repede prin procesul de putrefacţie.

Structura antigenică este complexă. În capsulă s-a determinat un constituent de natură proteică — polipeptidică, cu greutate moleculară mare, format din acid d-glutamic (Ivanovics-Bruckner, 1937, 1938). Acidul poliglutamic izolat sub formă de sare de sodiu prezintă proprietăţi antifagocitare şi antiantracoidale, fiind un factor al virulenţei tulpinilor. În corpul bacterian (soma) există un polizaharid specific. Polizaharizii au în compoziţia lor glucozamină, galactoză şi acid acetic; nu joacă rol în virulenţă.

Combiescu şi colaboratorii (1929) sînt printre primii autori care au izolat un polizaharid specific la *B. anthracis* şi au semnalat în constituţia polizaharidului prezenţa pentozei şi a acidului uronic.

Ionescu-Mihăieşti şi colaboratorii (1937), întrebuinţînd o tulpină capsulată şi alta necapsulată, în studiul asupra structurii antigenice a *B. anthracis*, găsesc că tulpina necapsulată este mai bogată în polizaharizi şi că în extractul din germenii capsulaţi, azotul se găseşte sub formă de aminoacizi; aminoacizii sînt absenţi în extrasele care provin din bacilii necapsulaţi.

Ivanovics (1940) constată că hexozaminele şi galactoza sînt singurii constituenţi ai polizaharidului specific al *B. anthracis*.

Prin inoculare de bacili capsulaţi omorîţi la iepure, se obţin seruri cu anticorpi pentru polipeptidele capsulare şi pentru polizaharizii somatici.

Din lichidul de edem al animalelor infectate s-a izolat o substanţă extracelulară, elaborată de *B. anthracis* în organismul animalului (Bail 1904). Această substanţă s-a obţinut şi *in vitro* pe medii semisintetice sau sintetice. Asupra acestei fracţiuni vom reveni.

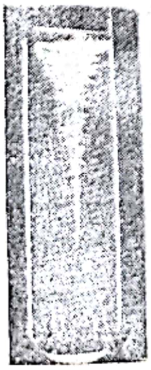


Fig. 130. — *B. anthracis*, cultură de 4 zile în gelatină dreaptă, cu lichefiere în formă de brad inversat.

Caractere de patogenitate. În mecanismul patogenităţii — capsula este o condiţie obligatorie. Polipeptidul capsular acţionează antifagocitar; bacilii necapsulaţi, chiar dacă provin dintr-o tulpină virulentă, sînt fagocitaţi. Capsula inhibează activitatea antibacteriană a principiilor care se găsesc în serul animalelor: variantele avirulente nu sintetizează polipeptidul capsular. În mecanismul patogenităţii mai acţionează şi toxina extracelulară obţinută din plasmă, din lichidul de edem, din exsudate şi *in vitro* în diferite medii de cultură, strîns legată de imunitate.

Încă din anul 1904, Bail a arătat existenţa agresinelor în lichidul de edem.

Existenţa unei toxine produse de *B. anthracis* fiind clinic evidentă, au fost făcute noi cercetări pentru izolarea şi studierea acestui factor.

Cromartie, Watson şi colaboratorii (1947) au obţinut un extract brut dintr-un edem antracoid, care, inoculat subcutanat produce tumefacţie şi imunizarea iepurelui.

Din acest extract s-au izolat prin ultracentrifugare două fracţiuni — fracţiunea I — denumită factorul inflamator, de natură lipoproteică, cu urme de hidraţi de carbon, care sedimentează rapid, şi fracţiunea II denumită antigenul protector, care este o proteină termostabilă, care rămîne în supernatant. La electroforeză migrează cu β- şi γ- globulinele. Cele două fracţiuni acţionează sinergic în producerea de edem şi letalitate.

S-a constatat că plasma provenită de la animalele infectate conţine cea mai mare cantitate de principii de natură extracelulară producătoare de edem, principii care cresc o dată cu bacteriemia. Plasma s-a dovedit a fi toxic letală, prin inocularea intraperitoneală şi intravenoasă la cobai şi şoareci.

Toxina a fost obţinută şi *in vitro*, în culturile de *B. anthracis*, pe medii formate din plasmă de cobai, oaie, cal, pe medii semisintetice şi sintetice; toxina poate fi titrată prin testul cutanat (producere de edem) şi prin testul letalităţii la şoarecii inoculaţi pe cale intravenoasă (Smith, Keppie, Thorne, 1958—1960). În ultimul timp Stanley, Smith etc. (1961—1962) au pus în evidenţă în lichidele organice provenind de la animale infectate, şi din filtratele culturilor de *Bacillus anthracis*, trei factori I, II, III. Factorii I + II acţionează sinergic în producerea de edem şi letalitate, factorul II singur este lipsit de toxicitate, dar conferă animalelor imunitate faţă de infecţia cu bacili virulenţi. Factorul III măreşte acţiunea letală a toxinei şi inhibă în parte acţiunea producătoare de edem. Factorii I şi III singuri sînt lipsiţi de activitate toxică.

Factorul I şi II au în compoziţie, aminoacizi, hidraţi de carbon şi fosfor, în proporţii diferite, iar factorul III — proteină, hidraţi de carbon şi lipoide.

Cauza morţii, în urma infecţiei cu cărbune, a fost foarte controversată. Unii au susţinut că ar fi datorită septicemiei cărbunoase, bacteriemia masivă producînd blocarea capilarelor sanguine; dar s-a văzut din numeroasele experienţe şi observaţii că animalele mor uneori cu o concentraţie mică de germeni în sînge, astfel încît în concepţia de astăzi s-a părăsit legătura cauzală dintre numărul de germeni şi cauza morţii.

Se consideră că moartea are la bază, pe lîngă alterări anatomopatologice, şi o serie de modificări fiziopatologice, care determină aşa-numitul „şoc secundar", cauzat de toxină, esenţial în producerea morţii.

Astfel se constată friabilitatea şi hemoliza eritrocitelor, prelungirea timpului de coagulare, hiperglicemia, urmată de hipoglicemia terminală, dereglarea echilibrului electrolitic cu perturbarea metabolismului calciului, al hidraţilor de carbon, al fosforului, scăderea cu 25 % din volumul sîngelui circulant înainte (cu 1—2 ore) de moarte, scăderea tensiunii, a temperaturii, leziuni renale şi o scădere a fosfatazei alcaline.

Infecţia experimentală. Şoarecele este animalul cel mai receptiv, fiind urmat de cobai şi iepure; aceste animale inoculate pe cale parenterală mor în 1—3 zile cu septicemie cărbunoasă. Antraxul cutanat şi subcutanat se caracterizează la cobai printr-o tumefacţie păstoasă locală, care influenţează puţin starea generală, spre deosebire de animalele mari, unde găsim febră ridicată. La autopsie se constată edem gelatinos-gălbui — splina mult mărită, friabilă, sîngele roşu închis şi îngroşat (cărbune). În ficat şi splină se găsesc cantităţi mari de bacili capsulaţi; în edem, mult mai puţini.

Rumegătoarele mici, caii, pot fi infectaţi pe cale parenterală.

Porcii şi cîinii sînt mai rezistenţi, se îmbolnăvesc cu totul excepţional şi prin infectare artificială, mor cu fenomene toxice şi edem gelatinos la locul inoculării.

Şobolanii sînt rezistenţi, păsările sînt foarte rezistente, iar animalele cu sînge rece la fel.

Doza minimă mortală variază cu specia animală şi cu tulpina folosită. Se pot obţine şi izola variante apatogene pentru cobai, dar care omoară şoarecele, sau apatogene pentru ambele specii animale. Variantele acapsulate nu produc septicemie la şoarece şi cobai.

Instalarea infecţiei depinde mult de poarta de pătrundere, receptivitatea variind după ţesuturi. După Besredka — pielea este singurul ţesut prin care se fixează şi se înmulţesc bacilii cărbunoşi. Pielea este mai receptivă, deoarece este mai puţin vascularizată — focarul inflamator se realizează mai greu — mobilizarea elementelor figurate şi umorale făcîndu-se mai încet (Combiescu).

Infectarea se poate obţine prin inoculare, intracutanat, subcutanat, intramuscular, intraperitoneal, intravenos, prin inhalaţie, prin ingestie.

Boala la om. Infecţia cărbunoasă este o boală care se întîlneşte mai ales la ierbivore (oi, vite, cai). Este o boală de păşune şi produce infecţii intestinale frecvente — ca rezultat al ingerării sporilor. O păşune infectată cu spori de cărbune poate rămîne izvor de infecţie timp de 20—30 de ani. Mortalitatea la ierbivore este de 80 %.

La om mai frecvent, apare antraxul cutanat, apoi cel pulmonar şi foarte rar cel digestiv.

Inocularea cutanată se face prin soluţii de continuitate ale pielii omului care lucrează cu vite, sau în industriile prelucrătoare ale produselor obţinute de la animale (piei, lînă etc.).

Antraxul pielii apare sub formă de pustulă malignă, leziune primară care apare la 12—24 de ore după inoculare. Poate fi unică sau multiplă şi este caracterizată prin lipsa durerii. După 2—3 zile se formează la locul maculei roşii o papulă care la început poate fi asemănătoare cu aceea a furunculului stafilococic, cu edem local. Apoi pe papulă se dezvoltă una sau mai multe vezicule seroase, mai tîrziu purulent-sanguinolente. Microorganismele pot fi uşor puse în evidenţă din aceste leziuni. Centrul prezintă o necroză crateriformă albastră-roșie-negricioasă, apoi neagră — cu limfangită și limfadenită care, în opoziție cu leziunea inițială, este foarte dureroasă.

În cazul pustulei maligne apărute pe față, edemul este foarte dezvoltat, iar prognosticul este mai puțin favorabil.

Cărbunele pulmonar are un debut violent, acut, cu febră mare, frison, fenomene de bronșită, apoi de pneumonie atipică. Apare mai ales la muncitorii care prelucrează lîna, pielea, perii, prin inhalarea de spori. Se poate diagnostica prin examenul sputei. Boala în majoritatea cazurilor duce la moarte.

Cărbunele intestinal, rar la om, apare în urma ingerării de carne infectată care a fost insuficient friptă sau fiartă. Tabloul clinic este al unei enterite cu scaune sero-sanguinolente, cu prognostic foarte grav. Pe mucoasa intestinului subțire se produc numeroase pustule maligne. Bacilii se găsesc foarte rar în fecale.

Imunitatea. La păsări, la animale cu sînge rece, șobolani se constată o înaltă rezistență. Rezistența variază după specie și chiar în interiorul unei specii sînt variații de rezistență (oile de Algeria rezistente). La păsări, factorul hotărîtor în rezistență este temperatura înaltă, iar dacă se scade temperatura se instalează infecția. Rezistența șobolanilor a fost atribuită de Behring puterii bactericide a serului lor sanguin, care face să dispară capsula, urmată fiind de dispariția germenului. La cîine s-a izolat din leucocite o substanță bactericidă pentru *B. anthracis*.

Chauveau (1879) constată instalarea unei imunități dobîndite active la animalele vindecate în urma unei infecții cărbunoase.

Pasteur și colaboratorii săi observă că bacilii cărbunoși crescuți în bulion la temperatura de 42°—43° se înmulțesc, pierd capacitatea de sporulație și prezintă atenuarea caracterelor de patogenitate. În acest mod, Pasteur pune bazele experimentale și științifice ale atenuării germenilor în scopul folosirii lor în imunizarea activă pentru prevenirea bolii.

În vaccinare se folosesc vaccinurile I și II, formate din culturi de bacili vii atenuați. Primul vaccin este format dintr-o cultură ținută timp de 15—20 de zile la 42—43°, patogenă pentru șoarece și cobaii tineri, al doilea vaccin este mai virulent; provenind dintr-o cultură ținută 10—12 zile la 42—43°, omoară și cobaii adulți și o parte din iepuri.

În celebra experiență de la Pouilly le Fort din 5 mai 1881, Pasteur vaccinează 24 de oi, o capră și 6 vaci, pe care le revaccinează la 17 mai. După 12 zile, animalele vaccinate și un număr egal de animale pentru control au fost infectate cu bacili virulenți. Animalele vaccinate au supraviețuit, în timp ce toți martorii au murit în urma infecției cărbunoase.

Pasteur și colaboratorii au elaborat nu numai metoda activă pentru profilaxia specifică a cărbunelui, dar în același timp au elaborat și metoda obținerii unei variante atenuate *in vitro* în același scop.

Vaccinul I este inoculat subcutanat la animalele din regiunile contaminate, iar după 12 zile se administrează vaccinul II; ulterior s-a folosit un singur vaccin patogen pentru cobai și pentru iepuri.

La noi în țară, Riegler a aplicat metoda pasteuriană pentru obținerea tulpinilor atenuate.

Se mai prepară vaccinuri din culturile unei tulpini acapsulate, edematogene și imunogene, obținută în laborator (tulpina Sterne-Stamatin).

O utilizare tot mai largă o au vaccinurile preparate din sporii tulpinilor necapsulate cu capacitatea de sintetizare a polipeptidului glutamic pierdută. Sporii proveniţi din forme atenuate dau naştere în condiţii favorabile de germinaţie la forme vegetative identice ca virulenţă cu cele care le-au produs. În felul acesta se elimină posibilitatea variaţiei virulenţei microbiene, evitîndu-se accidentele.

În anul 1904, Bail, apoi alţii (Cromartie etc.) au arătat că lichidul de edem cărbunos şi exsudatul recoltat de la animale infectate provoacă un oarecare grad de imunitate, fapt care a reprezentat punctul de plecare a experienţelor pentru găsirea şi izolarea antigenului imunizat, cu rol protector.

Acesta s-a putut izola *in vitro* din filtratul culturii unei tulpini de *B. anthracis* pe medii semisintetice şi sintetice. Pentru producerea acestui antigen protector *in vitro* se recomandă o tulpină neproteolitică (Wright şi colaboratorii, 1951). Animalele, cărora li se administra în două injecţii acest antigen adsorbit pe alaun, sînt protejate faţă de infecţia cărbunoasă.

Tratamentul specific. Sclavo şi Marchoux, în 1895, au preparat un ser anticărbunos pe iepure şi oaie. Serul anticărbunos se prepară azi de obicei pe cal obţinîndu-se un ser eficace. Se inoculează la început pe cale subcutanată sau intradermică culturi atenuate, corespunzînd celor două vaccinuri ale lui Pasteur, apoi la intervale de 7 zile doze crescînde de cultură virulentă.

Sîngerarea se face la 2—3 săptămîni după ultima inoculare. Titrarea se face pe şoareci, cobai sau iepuri, stabilindu-se protecţia conferită faţă de anumite tulpini.

În cazuri de infecţie cărbunoasă gravă se administrează ser anticărbunos împreună cu penicilină.

Chimioterapia. În tratamentul antraxului, salvarsanul s-a aplicat cu succes deosebit, administrîndu-se deseori împreună cu serul anticărbunos.

Bacilii cărbunoşi sînt deosebit de sensibili la acţiunea penicilinei, care într-o concentraţie de 0,009—0,037 u./ml inhibează creşterea unor tulpini; urmează ca eficienţă aureomicina şi teramicina —0,075—0,15 γ/ml, streptomicina 0,6—1,26 γ/ml şi cloramfenicolul 2,5—5 γ/ml.

Diagnosticul de laborator

Se realizează prin bacterioscopie, prin cultivarea germenului şi prin examene serologice.

Examenul bacteriologic. Materialul patologic pentru examene este foarte variat: serozitate din pustulă sau lichid de edem, recoltat cu ajutorul unei pipete efilate sau cu un tampon; 10—15 ml sînge pentru hemocultură; spută în cazul cărbunelui pulmonar; materii fecale în infecţie intestinală; fragmente de organe (splină, ficat, piele, păr, oase etc.).

În cărbunele cutanat se fac frotiuri din serozitate sau lichidul de edem şi se colorează cu albastru de metilen sau metoda Gram.

Se fac însămînţări în bulion şi pe o placă de geloză 2% sau geloză-sînge, iar după 24 de ore se observă colonii caracteristice, absenţa hemolizei prin care se diferenţiază de *Bac. cereus* şi de *Bac. megaterium.* Pe frotiuri, se constată absența mobilității. Se determină și termorezistența sporilor în apă clocotindă timp de 5—7 minute.

Hemocultura este indispensabilă în cazuri de bacteriemie; se însămînțează 10—20 ml sînge în 150—200 ml bulion. După 24 de ore se fac treceri pe geloză.

În cărbunele pulmonar se fac frotiuri din spută și se colorează după metoda Gram. Se fac însămînțări pe placă cu geloză și se practică și hemocultura.

În cazuri de cărbune intestinal, cînd materiile fecale sînt macroscopic hemoragice, se fac frotiuri și se colorează după metoda Gram. Se fac și hemoculturi.

Pentru izolarea *B. anthracis* din produse care conțin floră de asociație, se încălzește la 60—70° timp de 10 minute pentru distrugerea formelor vegetative, sau se însămînțează produsul în bulion, incubat 24 de ore la 37°, apoi germenii de asociație se distrug prin încălzirea culturii în bulion la 60—70°, după care se însămînțează pe geloză și se inoculează la animal.

După moartea omului sau animalelor se fac însămînțări pe geloză și frotiuri din organe (splină, ficat, piele), colorate cu albastru de metilen, cu Gram sau Giemsa; prezența bacililor capsulați este o indicație sigură de diagnostic. Cînd pieile sînt uscate, se folosește procedeul culturilor în plăci, după A. Ciucă. Se rade cu un bisturiu steril de pe suprafața internă a pielii puțin țesut. Acesta se pune într-un tub cu agar topit (10 ml) răcit la 65°. Tubul se mai păstrează încă timp de 15 minute la temperatura de 65° și apoi se varsă într-o placă Petri. După 24—48 de ore se observă coloniile.

În cazul izolării germenului din materialul patologic recoltat de la bolnavi de cărbune, se mai pot face:

1. Proba lizosensibilității cu fagii specifici, care permite un rezultat în 8 ore (McCloy). În țara noastră, primele studii asupra bacteriofagilor anticărbunoși și aplicarea acestora în diagnosticul bacteridiei cărbunoase au fost făcute de Ciucă, Stamatin, E. Zilișteanu și Nafta (1959).

2. Proba patogenității pe șoarece prin inocularea subcutanată a 0,5 ml dintr-o cultură de 24 de ore. Se face autopsia, se observă edemul caracteristic și se fac frotiuri din organe (splină). În cazuri pozitive se întîlnesc germeni capsulați.

Diagnosticul serologic. *Testul termoprecipitării Ascoli.* Este un mijloc de a stabili un diagnostic rapid din cadavre sau organe intrate în putrefacție, piei, ori țesuturi conservate în formol sau alcool. Culturile în majoritatea acestor cazuri sînt negative. Flora de putrefacție, ca urmare a acțiunii antagonismului microbian, distruge *B. anthracis* sau invadează mediul și inhibează dezvoltarea acestuia.

Testul se obține astfel: se taie în bucățele mici cîteva grame din organe (de exemplu splină, ficat); se fierbe într-un volum de 5 ori mai mare de ser fiziologic, se răcește și se filtrează. Într-un tub de reacție, la 0,5—1 ml de filtrat clar, se adaugă pe fundul eprubetei, cu ajutorul unei pipete Pasteur 0,5—1 ml ser precipitant anticărbunos. Extractul fiind mai ușor rămîne deasupra serului precipitant. În caz de reacție pozitivă la linia de contact a celor două lichide se formează — în decurs de 5—10 minute — un inel alburiu. Pentru control se folosește paralel: un tub martor pentru antigen (antigen + ser normal), un tub martor al serului precipitant (ser fiziologic + ser precipitant) și un tub martor pozitiv (extract de splină de la un animal mort de cărbune + ser precipitant specific).

Serul folosit în reacția Ascoli este produs prin imunizarea iepurilor sau a cailor cu bacili cărbunoși.

Epidemiologie

Antraxul este răspîndit în toată lumea; în unele țări din Europa de sud, Asia și Africa de nord apar epizootii întinse la bovidee, oi, capre, cai.

Este o boală a pășunilor, animalele făcînd de obicei forma intestinală. Pot fi și cazuri cutanate, ale mucoasei gurii și limbii. Musca poate fi considerată ca un vector posibil. Solul se contaminează prin fecalele, urina animalelor bolnave, a cadavrelor etc. Înmulțirea *B. anthracis* în sol nu este probabilă și nu a fost dovedită pînă în prezent. O pășune contaminată cu spori poate rămîne sursă de infecție timp de 20—30 de ani.

Morbiditatea este mai mare în lunile călduroase ale anului, ajungînd la maximum în luna august.

Există un raport numeric între antraxul la animale și la om, în general 3/1.

În 1938, cînd în țară au fost cele mai multe cazuri de antrax la animale, s-au constatat și cele mai ridicate cifre de morbiditate și mortalitate la om.

Infecțiile umane sînt, în majoritate, profesionale. Se îmbolnăvesc veterinarii, personalul abatoarelor, personalul care se ocupă cu prelucrarea, transportul pieilor, blănurilor, părului și lînei.

Pentru prevenirea bolii se cere un diagnostic rapid, cadavrele să fie distruse prin incinerare sau îngropare în gropi adînci de 2 m, acoperite cu var; vaccinări ale șeptelului, repetate în fiecare an, iar în unele sectoare, foarte contaminate, la fiecare 6 luni.

Carantinarea turmelor infectate cu antrax pe timp de 2 săptămîni, după ultimul diagnostic, se impune.

Laptele animalelor bolnave (izolate) nu va fi pus în consum.

Pentru persoanele care sînt în contact cu diferite materiale ce pot constitui sursa de infecție, în U.R.S.S., Anglia, S.U.A. se aplică vaccinări cu rezultate încurajatoare.

Educația sanitară este o condiție esențială a scăderii morbidității. Agricultorii trebuie să cunoască primele simptome ale bolii la om și la animale. Se va insista asupra pericolului pe care îl prezintă rănile și excoriațiile pe mîinile persoanelor care mînuiesc carnea și pieile infectate, precum și asupra consumului cărnii animalelor infectate.

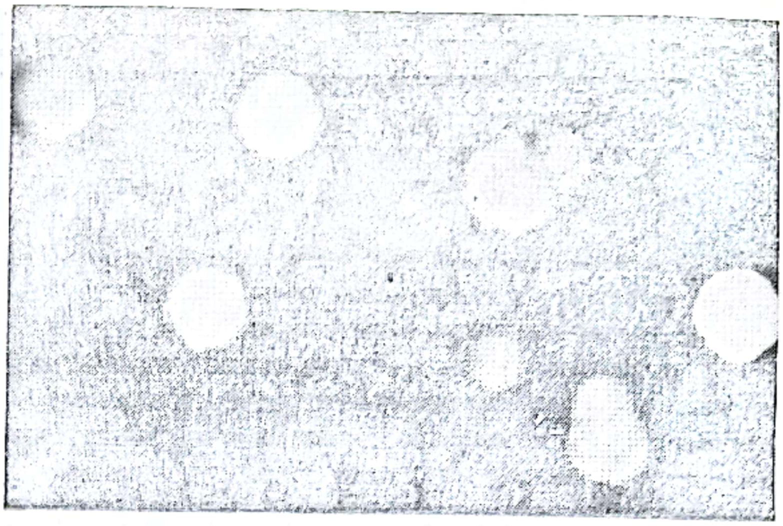
Bacillus cereus

Este un germen aerob foarte răspîndit în sol, praf, pe plante.

Morfologie: bastonașe de 3—5 μ lungime și 1 μ grosime, cu capetele retezate, formează lanțuri scurte sau lungi, încîlcite; este necapsulat; sporii sînt ovalari, centrali sau subterminali; mobil; gram-pozitiv.

Caractere de cultură: pe plăci de geloză, *B. cereus* dezvoltă colonii rotunde, 3—5 mm diametru, opace, cenușii-albe, cu marginea fimbriată,

Fig. 131. — *B. cerus*, colonii pe agar, după 24 de ore (×6).



cu suprafața granulată. Pe gelatină dreaptă, însămînțată prin înțepare, se produce o creștere filiformă și o lichefiere rapidă. Pe placa de geloză cu gelatină se constată o largă zonă de hidroliză în jurul punctului de însămînțare. Pe placa de geloză sînge se constată hemoliză marcată și rapidă.

În bulion, tulbură intens și uniform cu o peliculă și creștere inelară variabilă și cu sediment care se dispersează ușor.

În lapte, produce peptonizarea, iar în plăci cu geloză cu lapte, se observă hidroliza cazeinei.

Pe cartof, creșterea este abundentă, bogată, moale, cremoasă, uneori rozacee.

Caractere biochimice. *B. cereus* fermentează fără gaz, glucoza, zaharoza, glicerolul și salicina; hidrolizează amidonul, reduce nitrații în nitriți; formează acetilmetilcarbinol; amoniac-pozitiv. Produce lecitinază.

Temperatura optimă de creștere este 30°. Aerob și facultativ anaerob.

Produce o hemolizină solubilă pentru hematiile de oaie și o lecitinază activă asupra gălbenușului de ou. De asemenea produce o toxină solubilă, letală pentru șoarece (Bonventre, 1960).

Bacillus cereus, var. mycoides

Se deosebește de *B. cereus*, prin următoarele caractere: bastonașe de obicei mai subțiri, în lanțuri lungi, încîlcite; pe plăci cu geloză cresc colonii mari, cenușii, opace, întinse cu prelungiri rizoide și cu suprafața fin granulară.

Bacillus megaterium

Habitat. Este larg răspîndit în sol, praf, apă, lapte, materii în descompunere.

Morfologie. Bastonașe de 2—6 μ lungime și 1—1,5 μ grosime, cu capetele rotunjite, izolate sau în lanțuri scurte sau

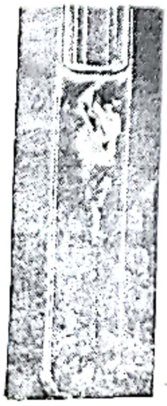
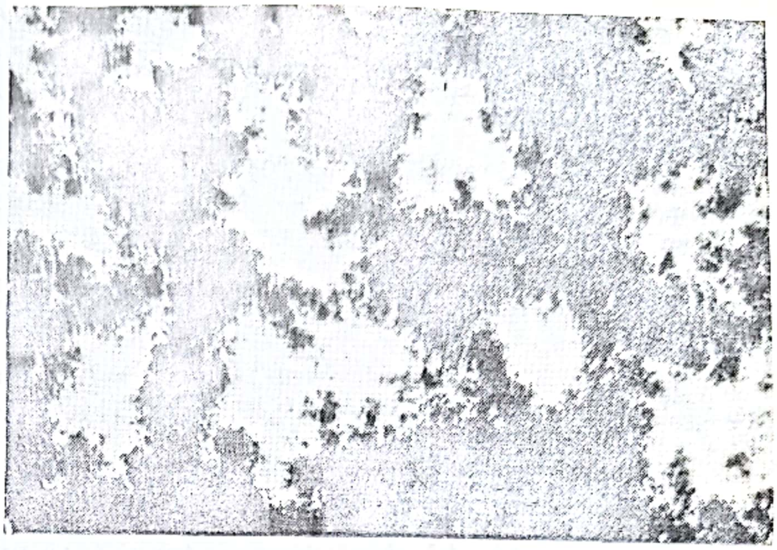


Fig. 132. — *B. cereus*, cultură de 4 zile în gelatină dreaptă, cu lichefiere infundibuliformă.

Fig. 133. — B. mycoides — colonii pe agar după 24 de ore (× 5).



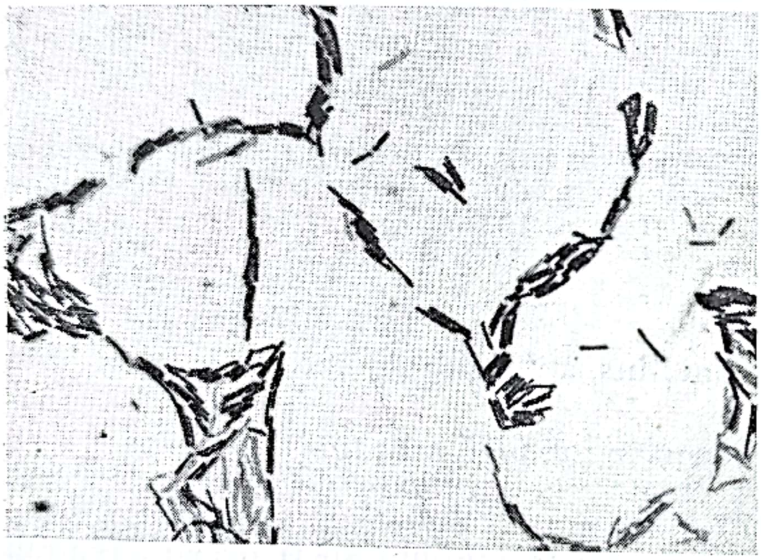


Fig. 134. — B. subtilis — cultură de 48 de ore (× 900).

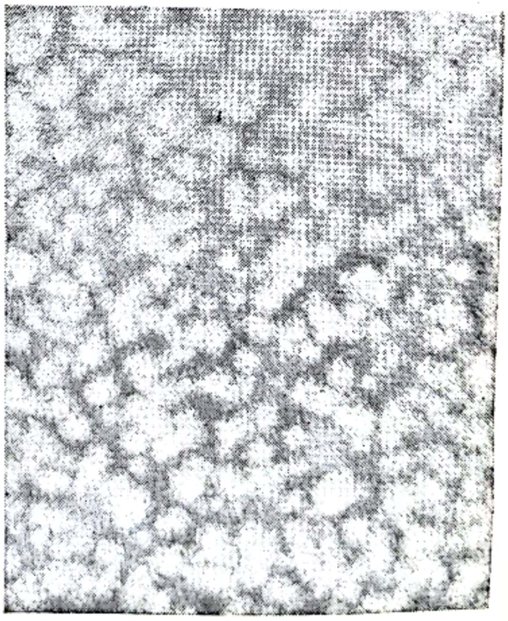


Fig. 135. — B. subtilis — colonii pe agar după 24 de ore (× 5).

lungi, apărînd ca filamente, uneori încîlcite. Protoplasma celulelor conţine globule de grăsimi. Mobili, cu 4—8 cili peritrichi, gram-pozitivi. Sporii sînt ovalari centrali sau subterminali; nu bombează celula. De obicei este necapsulat.

Caractere de cultură. Creşte pe medii uzuale, glucoza favorizează creşterea. Pe geloză în plăci — se prezintă sub formă de colonii rotunde, 3—5 mm diametru, uşor convex, rotund, cu suprafaţa netedă şi lucioasă, alb-cremos sau galben. Pe gelatină dreaptă se dezvoltă filiform, cu lichefacere înceată, în pîlnie; pe placă de gelatină-agar apare o zonă largă de hidroliză.

În bulion, *B. megaterium* provoacă o turbiditate abundentă şi uniformă, cu sau fără sediment abundent, fără peliculă.

Laptele este peptonizat.

Pe cartof dezvoltă o creştere abundentă, albă-cremoasă, moale, pînă la gălbuie ori roz.

Caractere biochimice. Fermentează fără producere de gaz — glucoza zaharoza, manita, arabinoza, xiloza şi glicerolul. Hidrolizează amidonul.

Nu produce acetilmetilcarbinol. Nu produce lecitinază. Produce o hemolizină puternică, în special pentru hematiile de om, cobai, maimuţă.

Temperatura optimă, între 28° şi 35°; aerob.

Structura antigenică: variantele capsulate conţin acid d-glutamic, ca şi la *B. anthracis* (Ivanovics, 1953); de asemenea conţin şi antigenul polizaharidic (Tomcsik şi Guex-Holzer, 1951).

Patogenitate: nepatogen.

Bacillus subtilis

Habitat. Este larg răspîndit în sol, praf, apă, fîn etc.

Morfologie. Bastonaşe drepte sau incurbate de 2—8 μ lungime, 0,7 μ grosime, izolate sau în lanţuri scurte. Colorat uniform, gram-pozitiv. Fără capsulă. Mobil, cu cili peritrichi; prezintă spori ovalari, centrali sau subterminali.

Caractere de cultură. Pe geloză, *B. subtilis* dezvoltă colonii opace uscate ca o peliculă întinsă, circulare sau neregulate, zbîrcite, centrul mai închis şi periferia mai deschisă. Pe gelatina dreaptă provoacă lichefierea destul de rapid, cu aspect crateriform spre stratiform; pe placă de agar-gelatină provoacă o largă zonă de hidroliză în jurul punctului de însămînţare.

În bulion, *B. subtilis* provoacă o peliculă zbîrcită, densă, fără sau cu o mică turbiditate, rareori o turbiditate uniformă sau floconoasă.

Pe cartof, cultura este bogată, zbîrcită, albă-gălbuie ori brună.

Caractere biochimice. Fermentează fără producere de gaz — arabinoza, xiloza, glucoza, zaharoza şi manita. Hidrolizează amidonul. Produce acetilmetilcarbinol. Reduce nitraţii în nitriţi, reduce albastrul de metilen.

Din unele tulpini se obţine antibioticul — subtilina, bacilina.

Temperatura optimă 28—40°; aerob.

Patogenitate. Cele mai multe tulpini sînt nepatogene, uneori pot provoca la om conjunctivite, iridociclite şi panoftalmii, cu totul excepţional bacteriemii. O cultură de 24 de ore în cantitate de 1 ml inoculată intraperitoneal la șoarece provoacă moartea. Cele mai multe tulpini sînt nepatogene.

Bacillus polymyxa

Habitat. Este larg răspîndit în sol, apă, materii fecale, plante.

Morfologie. Bastonașe izolate, de 2–7 μ lungime, 0,7–1 μ grosime; mobil; spori ovalari, centrali spre subterminali; bombează pereții celulei; gram-pozitiv.

Caractere de cultură. Pe geloză, *B. polymyxa* dezvoltă colonii subțiri, lobate ori fimbriate, translucide; pe gelatină dreaptă, creșterea este slabă, filiformă, cu lichefiere slabă, crateriformă.

În bulion, turbiditatea este uniformă sau granuloasă; sediment cleios, uneori peliculă la suprafață.

Pe cartof, creșterea este moderată sau abundentă; cartoful este descompus cu producere de gaz.

Laptele este coagulat cu producere de gaz.

Caractere biochimice. Fermentează cu producere de gaz: arabinoza, xiloza, ramnoza, glucoza, lactoza, manita și sorbita. Amidonul este hidrolizat. Produce acetilmetilcarbinol. Reduce nitrații în nitriți, reduce albastrul de metilen.

Din unele tulpini se obțin antibiotice cunoscute sub denumirea de polimixine.

Temperatura optimă 28–35°.

Patogenitate. Apatogen, pentru om și animale.

Bacillus brevis

Habitat. Este larg răspîndit în natură, sol, aer, praf, lapte etc.

Morfologie. Bastonașe izolate de 2–4 μ lungime, 0,6–0,9 μ grosime; mobil; frecvent gram-negativ; spori ovalari, centrali pînă la subterminali.

Caractere de cultură. Pe geloză *B. brevis* dezvoltă colonii subțiri, netede, translucide, întinse pe toată placa; inoculat în gelatină dreaptă cauzează o lichefiere înceată, crateriformă; pe placă de agar-gelatină produce o zonă largă de hidroliză.

În bulion turbură intens, uniform, uneori cu peliculă la suprafață.

Pe cartof, creșterea este moderată, cultura fiind roz ori brună.

Caractere biochimice. Fermentează fără producere de gaz, glucoza, zaharoza, manita. Reduce albastrul de metilen.

Din unele tulpini se obțin antibioticele gramicidina și tirocidina.

Temperatura optimă 28–40°, aerob, rar facultativ anaerob.

Bacillus circulans

Habitat. Larg răspîndit în natură, sol, apă, praf.

Morfologie. Bastonașe de 2–5 μ grosime, 0,5–0,7 μ grosime, cu capetele rotunjite izolate, rareori în lanțuri; mobil; gram-negativ; spori ovalari, mari, subterminali; bombează celula.

Caractere de cultură. Pe agar dezvoltă colonii subțiri, translucide, transparente. Din margine se pot detașa mici colonii cu mișcare circulară. Pe gelatina dreaptă provoacă lichefiere înceată, conică. Pe cartof, creștere invizibilă. În bulion, turbiditate ușoară, cu sediment floconos.

Caractere biochimice. Fermentează glucoza, arabinoza, xiloza, zaharoza. Hidrolizează amidonul. Reduce albastrul de metilen, reoxidîndu-l după cîteva zile.

Temperatura optimă 30°.

Bacillus pasteuri

Habitat. Larg răspîndit în natură — sol, gunoaie, ape reziduale.

Morfologie. Bastonașe izolate de 1,5—3,5 μ lungime, 0,6—0,9 μ grosime, cu capetele rotunjite; mobil; gram-variabil; spori ovalari cu așezare subterminală sau terminală.

Caractere de cultură. Crește pe medii care conțin uree sau amoniac, cu pH alcalin. Pe placă de geloză-uree dezvoltă colonii subțiri, translucide; în gelatină dreaptă cu uree, lichefierea este crateriformă, înceată. În bulion cu uree, turbiditatea pare uniformă.

Caractere biochimice. Nu fermentează hidrații de carbon.

Temperatura optimă între 28° și 35°; aerob, facultativ anaerob.

Bacillus stearothermophilus

Habitat. Larg răspîndit în natură — în sol și în alimentele fermentate.

Morfologie. Bastonașe de 2—5 μ lungime, 1 μ grosime. Mobil, gram-variabil. Spori ovalari, terminali, subterminali.

Caractere de cultură. Nu lichefiază gelatina. Fermentarea zaharurilor variază după tulpini.

Temperatura optimă 50—65°, uneori la 70°; aerob și facultativ anaerob.

Germenii anaerobi patogeni

Prof. N. Nestorescu

În raport cu folosirea oxigenului molecular, speciile bacteriene au fost împărțite în 3 clase:

Anaerobi stricți sau pur și simplu anaerobi care se dezvoltă numai în absența sau în prezența unei foarte mici cantități de oxigen (*microaerofili*).

Anaerobi facultativi, care cresc, atît în prezența, cît și în absența oxigenului.

Aerobi stricți, care se dezvoltă numai în prezența oxigenului molecular.

În natură, numărul cel mai mare de specii microbiene îl constituie bacteriile anaerobe.

Rolul lor în natură este pe cît de variat, pe atît de întins: spre exemplu iau parte la ciclul azotului și carbonului, la descompunerea reziduurilor animale și vegetale (fenomene de putrefacție), sintetizează unele materii organice, produc reducerea biologică a nitraților, iar singuri sau în asociație cu germeni aerobi, iau parte la formarea gazului metan și probabil a petrolului etc.

Cum habitatul lor normal este solul și cum activitatea lor este așa de largă, metabolismul florei autohtone a solului a fost comparat cu metabolismul de bază al animalelor (Thean-Jao-Tseng).

Studiul germenilor anaerobi prezintă numeroase și deosebite aspecte: în afară de cercetările de biologie generală, privitoare la fenomenele de adaptare a bacteriilor, care permit observații complementare asupra mecanismelor de variație microbiană, ca și asupra evoluției pe care o suferă germenii saprofiți în drumul lor spre parazitism, deosebit de cele cunoscute la germenii aerobi, germenii anaerobi oferă un cîmp vast de cercetare și pentru nevoi industriale și agrotehnice. Pe de altă parte, cercetările de ordin medical, care în ultima vreme au fost dintre cele mai importante, au mărit considerabil orizontul asupra bolilor pe care aceștia le determină.

Avînd un echipament enzimatic deosebit de bogat, format din numeroase enzime, care explică larga gamă a metabolismului pe care îl posedă, speciile anaerobe dau naştere la numeroase variante de germeni, care sînt des întîlnite în natură.

Din punct de vedere al capacităţii lor de infecţiozitate şi de patogenitate, comportarea lor este mult diferită de a germenilor aerobi patogeni; puţinele specii anaerobe, patogene, cu acţiune nocivă pentru om şi animale, existente printre numărul mare al germenilor anaerobi din natură, au nevoie de anumiţi factori favorizanţi, deseori indispensabili, care să acţioneze în vederea apariţiei unui fenomen nociv; simplul lor contact cu organismul receptiv este de multe ori insuficient pentru provocarea şi dezvoltarea infecţiei specifice.

Caracterul esenţial al acestor factori favorizanţi — oricît de variaţi ar fi ei — este legat de reducerea potenţialului local de oxidoreducere în timpul pătrunderii şi dezvoltării germenilor anaerobi. Acest lucru este necesar, fie că se referă la ţesuturile invadate (tetanos, gangrenă gazoasă, infecţii cu anaerobi nesporulaţi), fie că se referă la alimentele conservate, care cauzează toxiinfecţii anaerobe (toxiinfecţii alimentare cu *Cl. botulinum* sau *Cl. perfringens*).

Clasificare. Din cele peste 600 de specii anaerobe identificate pînă azi (Prévot), din punct de vedere medical interesează numai speciile — şi acestea numai cîteva — aparţinînd la două grupări importante:

1. germeni anaerobi virulenţi, dar nesporulaţi şi netoxigeni, care sînt întîlniţi mai cu seamă în cavităţile naturale ale omului şi animalelor, capabili să provoace boli foarte asemănătoare cu cele cauzate de germeni aerobi; aceşti germeni sînt cuprinşi în aşa-denumita flora endogenă;
2. germeni anaerobi, sporulaţi şi toxigeni, aparţinînd genului *Clostridium*, întîlniţi de obicei în sol şi care provoacă boli cu aspecte tipice particulare, cuprinşi într-o altă grupare, denumită floră exogenă.

A. Floră endogenă anaerobă

Infecţii cauzate de
- *Micrococi anaerobi*
  - *Streptococi anaerobi*
  - *Stafilococi anaerobi*
- *Bacteroidaceae*
  - *Ristella* (*Bacteroides*)
  - *Spherophorus*
  - *Fusobacterium*
- *Lactobacilleae* — *Ramibacterium*

B. Floră exogenă anaerobă

Infecţii cauzate de *Clostridium*
- *Cl.* (*Plectridium*) *tetani* — Tetanosul
- *Cl. perfringens*, *Cl. septicum*, *Cl. oedematiens*, *Cl. histolyticum* — gangrena gazoasă
- *Cl. botulinum* — toxiinfecţia botulinică

A. Infecţiile cu flora endogenă anaerobă

Infecţiile cu micrococi anaerobi

Printre aceste infecţii, cele mai frecvent întîlnite sînt cele cauzate de streptococii anaerobi. Aceşti germeni prezintă următoarele caracteristici:

Caractere morfologice şi tinctoriale: mai mici decît cocii aerobi, sînt aşezaţi de obicei în lanţuri. Sînt gram-pozitivi.

Caractere de cultură. Coloniile obţinute pe agar-sînge, incubate în anaerobioză, sînt de obicei mici, nehemolitice, ca picăturile de rouă. Alteori se întîlnesc tulpini hemolitice, antigenic înrudite cu streptococii aerobi hemolitici. Unele tulpini produc colonii mari opace, care prin expunere la aer devin pigmentate; altele produc colonii negre. Unii autori clasifică micrococii anaerobi după aspectul coloniilor pe geloză-sînge (Colebrook şi Harry).

Caractere biochimice. Anaerobi stricţi, se dezvoltă bine la 37°. În raport cu tulpinile studiate, se constată o întinsă variaţie a fermentării hidrocarbonatelor curent folosite, punînd în evidenţă un miros putrid caracteristic, care permite recunoaşterea prezenţei lor în eventualitatea unei culturi mixte. Hare şi colaboratorii au împărţit streptococii anaerobi în 6 grupe, după capacitatea de a forma gaz şi reacţii fermentative. Cele mai multe tulpini atacă hipuratul de sodiu (75%) şi cresc în prezenţa anumitor cantităţi de săruri biliare. Sînt sensibili la sulfamide şi antibiotice. Unele specii nu atacă lactoza, nu coagulează laptele şi nu produc acetoină (*Str. micros*); alte specii se comportă invers (*Str. intermedius*).

Structura antigenică nu este bine studiată, încît o identificare pe bază serologică nu este încă posibilă. Totuşi Roemer conchide că este o grupă heterogenă, înrudită cu *Str. viridans*. Cei hemolitici sînt înrudiţi cu streptococii din grupa A Lancefield. După Prévot, streptococii anaerobi ar poseda cel puţin două antigene.

Caractere de patogenitate. Virulenţa este redusă, unele tulpini posedă o moderată capacitate de invazie. Animalul de elecţie pentru studiul virulenţei este şoarecele alb. Nu a putut fi pusă în evidenţă, pînă în prezent, o toxină difuzibilă.

Infecţiile la om se caracterizează de obicei prin leziuni cronice, supurative, cu aspect putrid, deşi unele tulpini prezintă o tendinţă de invazie pe cale venoasă unde produc cheaguri septice, urmate de piemie terminală. Se întîlnesc în infecţii locale ale gurii, amigdalelor şi ţesuturilor retrofaringiene, ale vezicii biliare şi ale regiunilor perirectale şi periuretrale, în empiemele putride şi mai ales în infecţiile puerperale.

Infecţiile puerperale cu coci anaerobi sînt consecutive traumatismului obstetrical neobişnuit de intens, evoluţia lor terminîndu-se adesea cu o piemie cronică.

În plăgile de război, streptococii anaerobi sînt găsiţi de asemenea destul de des. Cottet îi întîlneşte în 30% din cazuri. Prezenţa lor în aceste plăgi, deşi uneori este anodină, determină în alte cazuri o vindecare încetinită. Ei sînt întîlniţi totdeauna în asociaţie cu alţi germeni (clostridii, spirochete, fuziformi).

Muşcăturile de om care după Bimtze sînt deosebit de grave, se complică adesea de edem şi exsudat putrid, în care se pun în evidenţă streptococi anaerobi, în asociaţie cu bacili fuziformi şi spirochete (Meleney).

Streptococii anaerobi, în asociaţie cu stafilococii aurii sau Proteus pot determina, în anumite condiţii, aşa-numita gangrenă postoperatoare care apare în urma unei intervenţii chirurgicale şi care se manifestă prin leziuni ale pielii, cu aspect gangrenos. Boala apare la 10–14 zile de la intervenţia chirurgicală. Această complicaţie, deşi este rară, este deosebit de gravă; ea determină o mortalitate de 50%. Boala a fost obţinută experimental de către Meleney, dar numai în cazurile în care a inoculat simultan streptococi anaerobi și stafilococi aurii.

O boală asemănătoare este ulcerul cronic subminant penetrant, care poate apărea după intervenții chirurgicale pe ganglioni limfatici sau pe tracturile gastro-intestinale și genitale. Boala este vindecabilă dacă la tratamentul chirurgical se introduce peroxid de zinc. Împreună cu streptococi hemolitici aerobi și stafilococi piogeni, streptococii anaerobi pot cauza și o miozită streptococică anaerobă, lipsită de clostridii, foarte asemănătoare gangrenei gazoase. Această complicație a plăgilor a fost observată mai des în al doilea război mondial. Se aplică tratament chirurgical, asociat cu sulfamide, care s-au dovedit foarte eficace.

Diagnostic de laborator

În genere, medicii de laborator nu folosesc totdeauna în diagnosticul bacteriologic metodele de însămînțare pentru germenii anaerobi; de aceea acești germeni sînt rareori puși în evidență în produsele patologice.

Prin urmare ca regulă generală, ori de cîte ori o plagă este rău mirositoare sau se observă în frotiuri germeni de morfologia celor descriși mai sus, produsul patologic trebuie să fie însămînțat pe medii anaerobe. Mediul care a dat rezultatele cele mai bune este bulionul-ficat, glucozat, sau geloza-sînge preparată cu bulion de inimă de vițel, la care se încorporează 30% ascită, 15% hematii de oaie și 1,5% glucoză (Meleney). Incubarea mediilor însămînțate se va face de preferință în aparatul McIntosh și durata ei va fi îndelungată. Plăcile incubate trebuie examinate, atît cu ochiul liber, cît și cu lupa și, eventual, cu microscopul. Se vor face totdeauna subculturi.

Hemocultura va fi practicată pe un mediu lichid, la care se adaugă un reductor puternic, de preferință tioglicolatul de sodiu, iar izolarea germenilor va fi făcută prin treceri pe geloză cu sînge, incubate de preferință în aparatul McIntosh.

Infecțiile cu Bacteroidaceae

Printre infecțiile cu acești germeni cele mai des întîlnite sînt cele cauzate de:

Genul Ristella

Infecțiile cauzate de genul *Ristella*, gen format din bacili asporulați și imobili, gram-negativi, dintre care specia cea mai bine cunoscută este *Ristella fragilis*, sînt uneori grave.

Ristella fragilis a fost descoperită de Veillon și Zuber, izolîndu-se ulterior din apendicite acute, gangrenă pulmonară, abcese urinare și septicemii.

Caractere morfologice. Bacili scurți și groși, cu capete rotunde, colorați mai intens la capete, apar izolați sau perechi, imobili, gram-negativi; nu prezintă polimorfism.

Caractere de cultură. Tulbură bulionul, cultura avînd un miros fetid. Pe agar, după 4—5 zile de incubație, apar colonii mici neregulate. Pe geloză-sînge formează colonii mici nehemolitice.

Caractere biochimice. Anaerob strict. Crește bine la 37°. Nu lichefiază gelatina, nu formează indol și hidrogen sulfurat, nu coagulează laptele. Fermentează maltoza, zaharoza, galactoza, glucoza, arabinoza și lactoza, ultimul zahar fiind folosit ca criteriu diferențial cu *Spherophorus funduliformis*.

Infecția la om. *R. fragilis* determină infecții puerperale, avort septic, amigdalite, cistite, piurii, abcese hepatice etc., însoțite de febră neregulată, cu evoluție lentă. Boala prezintă o fază septicemică și ulterior metastaze în articulații și viscere (mai ales în plămîn). Pleureziile purulente nu sînt rare. Tratamentul cu penicilină jugulează boala.

Infecția experimentală. Cele mai multe tulpini izolate nu s-au arătat virulente pentru animalele de laborator; unele tulpini însă pot provoca la cobai abcese care duc la moarte. Tulpinile inoculate pe cale intravenoasă la șoarece și iepure sînt nocive, determinînd abcese în articulații și viscere. La iepure și cobai iocularea subcutanată de cultură provoacă o gangrenă necrotică severă, cu bacteriemie consecutivă.

Ristellla melaninogenica, asemănătoare *R. fragilis*, elaborează un pigment negru, format dintr-un complex de hematină și o proteină bacteriană pe care îl produce pe mediu cu sînge. *R. melaninogenica* nu crește decît pe medii cu sînge sau medii uzuale, cărora li s-a încorporat hematină, aceasta din urmă fiind un factor de creștere esențial pentru această specie. *R. melaninogenica* a fost izolată din abcese pulmonare; în asociație cu alți germeni puterea ei patogenă crește considerabil, provocînd procese inflamatorii fetide (Hite).

Genul Spherophorus

Infecțiile cauzate de germenii din genul *Spherophorus* sînt foarte severe. Speciile aparținînd acestui gen sînt bacili imobili, asporulați, gram-negativi, foarte polimorfi, colorați bipolar; prezintă un ciclu de reproducere proto-sexuat, ducînd la formarea de sferule libere, posedînd un aparat nuclear complex și variabil după fază (Prévot).

Specia tip, cea mai bine studiată, este *Spherophorus funduliformis*, descoperit de Halle. Germenul a fost izolat din vagin, intestin, infecții urinare, infecții puerperale, apendicite acute, gangrenă pulmonară, abcese hepatice, septicemii. *Sph. freundi*, foarte rezistent la antibiotice, a fost întîlnit în apendicite și pleurezii purulente.

Caractere morfologice. Bacili drepți sau ușor încurbați, 1,5—3 μ, imobili, nesporulați, Gram-negativi. Pe medii de cultură este extrem de polimorf, prezentînd forme cocoide, filamentoase sau ramificate. Dienes și Smith au descris la acești germeni, pentru prima dată, formele „L'' ale bacteriilor. Unii autori sînt de părere că pot prezenta și înmulțire sexuată.

Caractere de cultură. In bulion-ser crește în flocoane; pe bulion glucozat crește rapid cu miros fetid; aceste medii nu sînt tulburate omogen. Pe agar-sînge produce colonii mici, rotunde, înconjurate de o zonă de hemoliză. Alături de colonii normale, Dienes a observat și colonii fine, asemănătoare coloniilor tinere de P.P.L.O. (virusul care determină pleuropneumonia bovideelor), repicabile în serie (colonii de tip „L"). Sevens a obținut colonii „R" și „S".

Caractere biochimice. Anaerob strict, crește la 37°. Nu lichefiază gelatina, produce indol în culturi vechi, produce H_2S. Acidifică și coagulează laptele. Fermentează fructoza, glucoza, maltoza. Nu atacă lactoza (unele tulpini atacă însă).

Structura antigenică este puțin cunoscută. Considerat identic cu *Sph. necrophorus*, s-a dovedit ulterior că este deosebit (prin reacțiile de aglutinare).

Caractere de patogenitate. S-a putut extrage o substanță care, introdusă pe cale intravenoasă, s-a dovedit toxică pentru șoarece și cu acțiune necrozantă dacă este injectată sub piele sau în mușchi; aceasta este solubilă în apă distilată și precipitabilă prin serul omolog.

Iepurele este animalul sensibil. Inocularea unei cantități anumite de germeni determină infecții piemice. Boala experimentală a fost bine studiată la noi, de către V. Ștefănescu.

Boala la om. Debutul se face mai totdeauna printr-o angină dureroasă cu adenopatie cervicală, însoțită de frisoane repetate și febră ridicată; rareori printr-un avort septic sau colită. Se instalează apoi o fază trombo-flebitică, cu stare generală rea, însoțită de hemoculturi pozitive (bacteriemie) și localizări secundare (empiem putrid, abcese musculare, artrite purulente, endocardite vegetante, abcese miliare în rinichi și ficat, meningite etc.). Caracterul comun al leziunilor viscerale este necroza.

În țara noastră boala a fost studiată de către N. Gh. Lupu și Litarczek.

Tratamentul chirurgical asociat cu sulfamidoterapie și mai ales cu penicilinoterapie dă rezultate foarte bune în formele incipiente; formele grave, înainte de penicilinoterapie, erau deseori mortale.

Genul Fusobacterium

Genul *Fusobacterium* conține cel puțin 6 specii de germeni care pot fi patogene pentru om și animale.

Fusobacterium fusiforme sin. *Bacillus fusiformis* este specia cea mai des întîlnită. Se prezintă sub formă de bacil cu extremități efilate, care uneori iau formă de spirochete ondulate.

La microscopul electronic, *F. fusiforme* prezintă ramificații. Trecerea prin forme „L" este o fază normală a acestui germen.

A fost întîlnit în angina Vincent, periodontită, pioree alveolară, stomatită ulceroasă, gingivită ulceroasă, pleurezii purulente, abcese ale creierului.

Poate crește în bulion peptonat, adiționat cu vitamina C, sub ulei de vaselină. Adăugarea de salivă sterilă la bulionul peptonat nu mai face necesară tehnica anaerobă. Saliva conține un factor de creștere termolabil, labil la acizi și baze, indispensabil *F. fusiforme*. O mică concentrație de CO_2 (0,03%) este necesară culturilor în serie.

Bulionul glucozat este puternic acidifiat; se preferă bulionul-ser sau bulionul în care s-a incorporat vitamina C.

F. fusiforme fermentează glucoza, levuloza, galactoza, maltoza, lactoza, arabinoza, xiloza şi manitolul. Produce indol şi H_2S.

F. fusiforme sînt patogene pentru şoareci, cărora le provoacă un sindrom toxico-septic. În asociaţie cu alţi germeni puterea patogenă creşte evident.

Infecţiile cu Lactobacilleae

Tribul Lactobacilleae conţine mai multe genuri, dintre care unele sînt formate din specii patogene, pentru om (*Catenabacterium*, *Cilobacterium*, *Ramibacterium*).

Genul Ramibacterium

Infecţiile cele mai bine cunoscute sînt cele cauzate de *Ramibacterium ramosus*. Speciile sînt formate din bacili asporulaţi, neîncapsulaţi imobili, Gram-pozitivi, prezentînd pseudoramificaţii în V şi Y.

Ramibacterium ramosus a fost descoperit de către Veillon şi Zuber, în 1898.

Caractere morfologice. Bacil mic, imobil şi nesporulat, grampozitiv.

Caractere de cultură. Pe geloză-sînge, în anaerobioză formează colonii mici, nehemolitice.

Caractere biochimice. Anaerob strict. Slab zaharolitic; atacă puternic lactoza, mai slab glucoza şi zaharoza. Nu lichefiază gelatina şi nu formează indol. Produce acetoină, semn important pentru identificare.

Infecţia la om a fost bine studiată de Lemierre şi Reilly. *R. ramosus* poate determina abcese în diferite organe, inclusiv creierul, după o prealabilă fază septicemică. Se tratează cu sulfamide.

Infecţia experimentală. Injectarea culturilor de *R. ramosus* pe cale intravenoasă, la iepure, produce moartea în cîteva zile. Este patogen pentru cobai, cauzînd abcese, caşexie şi moarte.

B. Infecţiile cu flora exogenă anaerobă

Genul Clostridium

Generalităţi. Aceste infecţii sînt datorite unor germeni anaerobi sau microaerofili, prevăzuţi cu spori, Gram-pozitivi şi toxigeni. Biometria acestor germeni diferă cel mai adesea cu specia şi vechimea culturii (3—10 μ lungime şi 0,3—1,2 μ grosime). Din punct de vedere morfologic, se caracterizează printr-un polimorfism accentuat, legat uneori de frecvente fenomene de autoliză, pe care le suferă forma lor vegetativă la începutul sporulaţiei.

F. fusiforme fermentează glucoza, levuloza, galactoza, maltoza, lactoza, arabinoza, xiloza şi manitolul. Produce indol şi H_2S.

F. fusiforme sînt patogene pentru şoareci, cărora le provoacă un sindrom toxico-septic. În asociaţie cu alţi germeni puterea patogenă creşte evident.

Infecţiile cu Lactobacilleae

Tribul Lactobacilleae conţine mai multe genuri, dintre care unele sînt formate din specii patogene, pentru om (*Catenabacterium*, *Cilobacterium*, *Ramibacterium*).

Genul Ramibacterium

Infecţiile cele mai bine cunoscute sînt cele cauzate de *Ramibacterium ramosus*. Speciile sînt formate din bacili asporulaţi, neîncapsulaţi imobili, Gram-pozitivi, prezentînd pseudoramificaţii în V şi Y.

Ramibacterium ramosus a fost descoperit de către Veillon şi Zuber, în 1898.

Caractere morfologice. Bacil mic, imobil şi nesporulat, grampozitiv.

Caractere de cultură. Pe geloză-sînge, în anaerobioză formează colonii mici, nehemolitice.

Caractere biochimice. Anaerob strict. Slab zaharolitic ; atacă puternic lactoza, mai slab glucoza şi zaharoza. Nu lichefiază gelatina şi nu formează indol. Produce acetoină, semn important pentru identificare.

Infecţia la om a fost bine studiată de Lemierre şi Reilly. *R. ramosus* poate determina abcese în diferite organe, inclusiv creierul, după o prealabilă fază septicemică. Se tratează cu sulfamide.

Infecţia experimentală. Injectarea culturilor de *R. ramosus* pe cale intravenoasă, la iepure, produce moartea în cîteva zile. Este patogen pentru cobai, cauzînd abcese, caşexie şi moarte.

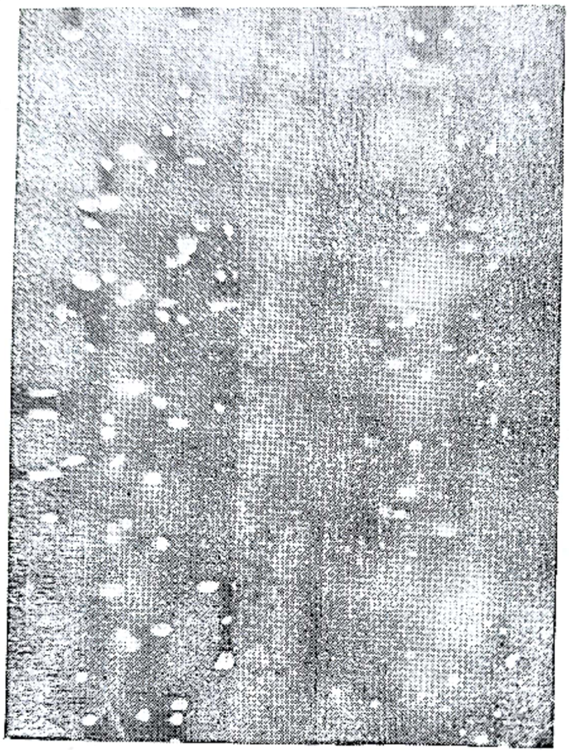
B. Infecţiile cu flora exogenă anaerobă

Genul Clostridium

Generalităţi. Aceste infecţii sînt datorite unor germeni anaerobi sau microaerofili, prevăzuţi cu spori, Gram-pozitivi şi toxigeni. Biometria acestor germeni diferă cel mai adesea cu specia şi vechimea culturii (3—10 μ lungime şi 0,3—1,2 μ grosime). Din punct de vedere morfologic, se caracterizează printr-un polimorfism accentuat, legat uneori de frecvente fenomene de autoliză, pe care le suferă forma lor vegetativă la începutul sporulaţiei.

Sporulaţia este comună la toate speciile, dar există variaţii considerabile în condiţiile ei de apariţie, legate în special de mediul nutritiv în care se găsesc.

Diametrul sporilor este mult mai mare decît grosimea formelor vegetative care îi poartă, iar dispoziţia lor în raport cu forma vegetativă este variată după specie : la unele, sporul are o poziţie ecuatorială sau subterminală ; la altele, sporul oval sau sferic este terminal. Poziţia sporului faţă de forma vegetativă ajută la orientarea diagnosticului bacteriologic.



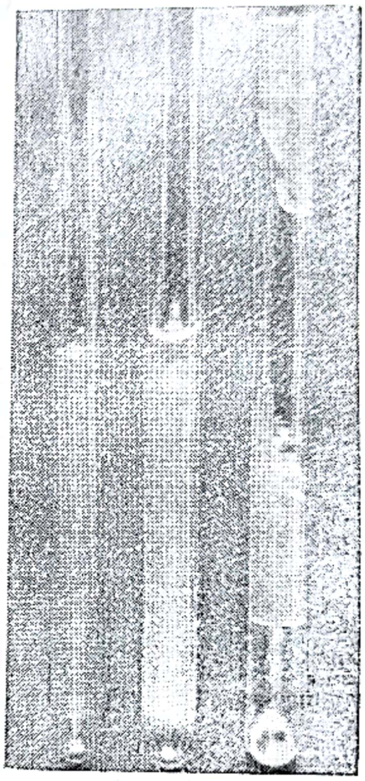


Fig. 136 — Aspecte variate ale coloniilor din genul *Clostridium* :
stinga — colonii lenticulare şi în grenadă; *dreapta* — colonii pufoase

Fig. 137. — Culturi de clostridii pe agar în coloană.
Stinga: geloză glucozată neînsămînţată; *mijloc:* geloză glucozată însămînţată cu o tulpină de *Clostridium* neproducătoare de gaze; *dreapta:* geloză glucozată însămînţată cu *Cl. perfringens*.

Cu excepţia *Cl. perfringens*, care posedă capsulă, toate celelalte specii sînt mobile, datorită cililor peritrichi, variabili ca număr, după vîrsta culturii şi specia microbiană căreia ne adresăm.

Caractere de cultură. Pe medii lichide ca bulion, bulion glucozat, lapte etc., lipsite de oxigen, clostridiile cresc relativ uşor. Ele tulbură uniform aceste medii, sedimentînd ulterior ; în culturi mai vechi, mediile se limpezesc datorită unei lize accentuate a germenilor. În faza logaritmică de creştere, culturile în medii lichide capătă un miros caracteristic, de obicei neplăcut, diferenţiat după speciile microbiene în cauză.

Pe medii solide, ca agarul în coloană, clostridiile dau naştere la colonii cu aspect variat, în raport cu specia. Unele colonii sînt biconvexe (*Cl. perfringens*); altele sînt asemănătoare pufului de păpădie şi cu un centru opac (*Cl. tetani*, *Cl. septicum*); în fine, altele sînt cu un aspect pufos numai la un pol al coloniei, asemănătoare unei grenade în explozie (*Cl. oedematiens*). Aspectul pufos al coloniilor pare legat de prezenţa cililor; prin disociere (Condrea), sau sub acţiunea unor antiseptice (tripaflavina) (Nestorescu), se obţin variante aciliate, acestea împrumutînd numai aspectul lenticular, lipsit de puful înconjurător.

Pe agar în coloană, cu zaharuri fermentescibile — spre exemplu agarul glucozat — clostridiile anaerobe provoacă spargerea şi detaşarea în fragmente a mediului, datorită gazelor consecutive fermentaţiei.

Caractere metabolice. Creşterea germenilor anaerobi patogeni aparţinînd genului *Clostridium* nu se poate obţine în medii lipsite complet de aer; fiecare specie microbiană în parte cere un anumit potenţial de oxidoreducere, care îi este convenabil.

Datorită microaerofiliei lor, creşterea acestor specii se obţine relativ uşor dacă la mediile de cultură se adaugă substanţe reductoare, ca: sulfiţi, compuşi de fier redus, acizi graşi nesaturaţi, glucoză activă, cisteină, glutation, acid ascorbic, acid tioglicolic etc. Carnea tocată şi uşor prăjită, adăugată la medii lichide, conţine substanţe reductoare, eficiente.

Germenii din genul *Clostridium* au nevoie de anumiţi metaboliţi esenţiali, printre care fierul joacă un rol important. Magneziul este activatorul obligatoriu al enzimelor, iar dintre vitamine, biotina, piridoxina şi acidul pantotenic sînt indispensabile. Creşterea lor este dependentă şi de utilizarea unor aminoacizi. Aceste necesităţi nutritive clasează clostridiile patogene printre germenii heterotrofi.

Acţiunea diferenţială a clostridiilor patogene faţă de zaharuri permite constituirea unor criterii de identificare într-un ansamblu de cercetare. După cum fermentează un număr mai mare sau mai mic din aceste substanţe, clostridiile au fost împărţite în zaharolitice şi nezaharolitice.

Unele specii produc o cantitate considerabilă de gaz, care constă din CO_2 şi H_2 în proporţie variabilă după specii (*Cl. perfringens* în proporţii mari, *Cl. histolyticum* nu dezvoltă gaz). Formarea indolului, ca şi reducerea nitraţilor în nitriţi este variabilă în proporţiile substanţelor care se găsesc în mediu.

Structura antigenică. Variază cu specia şi chiar cu tulpina microbiană căreia ne adresăm. *Cl. perfringens*, germen neciliat dar încapsulat, posedă în afara antigenului „O" termostabil şi un antigen somatic termolabil. Prezenţa antigenului termolabil pare să fie legată de prezenţa unei anumite componente toxice (ε). Celelalte specii clostridiale, care sînt mobile, posedă pe lîngă antigenul „O" şi antigenul „H", ultimul imprimînd tipul serologic în cadrul speciilor (*Cl. tetani*, *Cl. septicum*, *Cl. botulinum*, *Cl. chauvoei*).

Relaţiile dintre structura antigenică a clostridiilor şi capacitatea lor de toxinogeneză sînt încă puţin studiate; la unele specii raportul dintre tipul serologic şi puterea de toxigeneză este uneori semnalat (*Cl. tetani*), însă la cele mai multe specii şi serotipuri nu se constată o corelaţie între capacitatea de toxigeneză şi testele de aglutinare, precipitare şi fixare de complement.

O particularitate interesantă o constituie unicitatea toxinei diferitelor serotipuri de clostridii patogene; în general, oricare ar fi tipul serologic al unei tulpini toxigene, ea va elabora o toxină unică, neutralizată de serul antitoxic specific, preparat cu oricare altă tulpină care ar aparţine oricărui alt tip serologic.

Caractere de patogenitate. Toxigeneza este caracterul dominant de patogenitate al clostridiilor patogene. Clostridiile produc mai mult de 20 de toxine, în afară de factori de invazie (hialuronidază), sau enzime proteolitice. Toxinele, tip de exotoxine, sînt de natură strict proteică; purificate, ele nu conţin grupări prostetice. Unele toxine sînt enzime (lecitinaza *Cl. perfringens*). Parte din aceste toxine au fost cristalizate (toxina tetanică şi botulinică, tip A). Sînt formate din molecule mari, posedînd greutate moleculară ridicată (60 000 – 900 000).

Sub acţiunea fermenţilor, unele din aceste toxine nu sînt desfăcute în componente inactive (toxinele botulinice), altele sînt rezistente la temperaturi ridicate (80° timp de 30 de minute), sau sînt chiar termoregenerate (toxina *Cl. perfringens*, tip A, este inactivă la 70° şi îşi recapătă din activitate dacă este reîncălzită la 100°).

Toxinele germenilor anaerobi sporulaţi sînt active, însă activitatea lor poate fi puternică sau slabă, rapidă sau lentă, după specia şi chiar tulpina care le elaborează.

Toxina botulinică elaborată de *Cl. botulinum*, tip A, este cea mai puternică otravă cunoscută, indiferent de natura chimică sau biologică din care acestea din urmă ar proveni. Toxina α a *Cl. perfringens* este mult mai puţin activă. Aceste diferenţe fac ca susceptibilitatea diferitelor specii animale la o toxină dată să varieze considerabil.

Pielea constituie un substrat foarte susceptibil pentru multe din toxinele anaerobe; dacă acest substrat nu este atacat de unele dintre aceste toxine, faptul pare să ţină de capacitatea pe care o au acestea de a ataca ţesuturi mult mai specializate.

Toxinele germenilor anaerobi patogeni posedă o manifestă acţiune farmacodinamică specifică, care cauzează boli deosebit de caracteristice din punct de vedere clinic; aceasta face ca, pentru diagnosticul lor, examenele bacteriologice sau serologice să nu fie indispensabile (tetanos, botulism, gangrenă gazoasă).

La unele specii (*Cl. perfringens*, *Cl. histolyticum*) acţiunea letală a toxinei se manifestă fără perioade de incubaţie; este suficient să se introducă pe cale intravenoasă la animale sensibile numai o singură doză certă mortală, ca aceste animale să sucombe în cîteva momente, pe cînd pentru toxinele botulinică şi tetanică, oricîte doze am inocula, perioada cuprinsă de la inoculare şi pînă la moarte este de minimum 8 ore.

DLM i.v.

Toxinele anaerobe posedă efecte nocive multiple: hemolitică, dermonecrotică, neurotoxică, letală etc. Acţiunea hemolitică este manifestă pentru eritrocite provenite de la numeroase specii animale (cal, oaie, om etc.). Hemolizinele, de aspect α sau β, după specia microbiană în cauză, sînt mai totdeauna labile în prezenţa oxigenului (aerului) şi active numai în prezenţa unor substanţe chimice în stare de ionizare (Ca, Mg etc.). Alte substanţe, din contră, sînt inhibitoare. Unele din hemolizine care şi-au pierdut activitatea în prezenţa oxigenului, puse în contact cu substanţe reductoare, îşi recapătă activitatea.

Acţiunea dermonecrotică este evidentă pentru multe clostridii patogene (clostridiile gangrenoase); ea pare datorită acţiunii pe care o au aceste toxine asupra lipoizilor din membranele celulare.

Acţiunea neurotoxică a toxinei tetanice, spre pildă, este dovedită prin leziunile sistemului nervos care constau, printre altele, din alterările filetului neurofibrilar Donaggio, marcate, mai ales, la nivelul cerebelului.

Acţiunea letală a toxinelor este în funcţie de specia şi chiar de tulpina anaerobă care le elaborează, de doza inoculată, de sensibilitatea animalelor folosite în experienţă, precum şi de calea de inoculare. Mecanismele morţii sînt multiple şi complexe, intoxicaţia mortală fiind deseori favorizată şi de alţi factori, ca resorbţia ţesuturilor devitalizate, factori de invazie, enzime proteolitice etc.

Constituenţii toxici ai toxinelor anaerobe sînt multipli. Unii din ei sînt nespecifici (pseudotoxinele termostabile şi neantigenice de *Cl. perfringens*, *Cl. septicum*, *Cl. botulinum* etc.); cei mai mulţi sînt însă specifici şi antigenici.

Toxina tetanică este compusă din două substanţe diferite: tetanospasmina, care provoacă sindromul tetanic, şi tetanolizina, care hemolizează eritrocitele; de fapt, cu ajutorul metodei de difuziune în gel, Rafyi a demonstrat că toxina tetanică este un complex de numeroase antigene şi haptene liberate prin autoliza *Cl. tetani*.

Constituenţii toxinelor botulinice sînt hemolitici, neurotoxici şi hemaglutinanţi. Constituenţii hemolitici sînt termolabili, oxidabili şi slab activi, mult asemănători lecitinazei *Cl. perfringens*; toxina letală este specific botuligenă şi foarte activă; sînt prezenţi, de asemenea, un factor termolabil, alterabil prin învechire şi care nu poate fi neutralizat printr-un antiser specific (pseudotoxina?), precum şi un factor hemaglutinant, care are capacitatea de a fi adsorbit pe numeroase alte ţesuturi animale în afara hematiilor, ceea ce permite să fie întîlnit chiar şi în toxine botulinice purificate şi cristalizate.

Constituenţii toxinelor germenilor gangrenoşi sînt cei mai numeroşi; numai toxinele tipurilor *Cl. perfringens* sînt în număr de 11.

Pentru toxina *Cl. oedematiens* se cunosc azi 6 componente; pentru *Cl. septicum* 2 (hemolitică şi letală), iar pentru *Cl. histolyticum* 3 componente în afara activităţii ei fibrinolitice.

Constituenţii toxici ai germenilor gangrenoşi au primit simboluri diferite, folosindu-se literele mici ale alfabetului grec: α, β, γ, δ, ε, η, θ, ι, ϰ, λ. Natura unora din aceste componente este bine cunoscută (enzime), pentru altele încă nu.

În afară de constituenţii toxici descrişi mai sus, unele specii microbiene anaerobe conţin şi alţi factori enzimatici, cum sînt colagenazele, hialuronidazele, mucinazele etc. Aceste componente, deşi nu sînt toxice prin ele însele, contribuie la capacitatea de invazie a germenilor anaerobi prin mecanismul cunoscut al scăderii tonusului ţesutului conjunctiv, ca urmare a depolimerizării substratului de bază al substanţelor intermediare ale acestui ţesut.

Bolile clostridiale la om şi animale. Omul şi unele animale fac spontan boli cauzate de clostridii; cele mai importante sînt tetanosul şi gangrena gazoasă, care de fapt sînt complicaţii ale plăgilor, precum şi botulismul, care este o toxiinfecţie mai totdeauna de origine alimentară.

Clostridium tetani și toxiinfecția tetanică

Sin. *Bacillus tetani*; *Pacinia nicolaieri*; *Plectridium tetani*.

Istoric. Datorită simptomatologiei specifice, tetanosul a fost identificat din timpuri foarte vechi, dar abia în 1884 a putut fi transmis la iepure de către Carle și Rattoni, inoculînd produsul unei plăgi tetanigene.

În același an, Nicolaier, folosind pămîntul de grădină ca material de inoculare la animale de experiență, pune în evidență *Cl. tetani*, descriindu-i caracterele morfologice și caracterul strict local al infecției. În 1889 Kitasato completează descrierea germenului, iar Knud Faber arată caracterul toxic al filtratului de cultură.

Behring descoperă calitățile neutralizante ale antitoxinei tetanice, iar Ramon (1925) prepară anatoxina tetanică și stabilește puterea ei vaccinantă.

Habitat. *Cl. tetani* se găsește în pămînt — în special în cel cultivat — precum și în intestinul omului și animalelor. Burnet îl găsește în praful cules din apartamente. În fecalele animalelor nutrite cu furaje, *Cl. tetani* a fost mai des întîlnit la cai, unde persistența sa este îndelungată, ca și la cobai. Este mai rar întîlnit în intestinul bovinelor și leporidelor.

În intestinul omului a fost pus în evidență încă din 1888, de către Pizzini. Cercetări ulterioare au arătat că repartiția sa la om ține mai ales de anumite zone geografice (frecvent în Extremul Orient și Canada, mai rar în Europa). Prezența sa a fost semnalată de la 0,5% pînă la 34,7% (Tenbroeck și Bauer).

Caractere morfologice. Formă de bacil, de 3—4/0,4 μ, prevăzut cu spori, de formă rotundă și rar ovalar, așezați în majoritatea cazurilor terminal, mai rar central (Heller). Prezintă cili peritrichi, numeroși, flexuoși și lungi. În absența oxigenului, *Cl. tetani* este extrem de mobil, deși în general este considerat moderat mobil. Au fost întîlnite și variante imobile; neincapsulat; gram-pozitiv.

Caractere de cultură. În medii lichide, în bulion, crește tulburînd ușor, cu prezența de bule gazoase, depunînd ulterior un depozit pulverulent și degajînd un miros de corn ars.

Pe geloză în coloană se dezvoltă colonii mai întîi sferice, care se înconjură de o zonă pufoasă. Mediul conține numeroase bule de gaz. În geloză 0,5% *Cl. tetani*, astfel cum a arătat Condrea, se disociază ușor, aspectul coloniilor putînd fi pufos (D), difuz (S), lenticular (R) și intermediar (La).

Pe geloză-sînge în coloană, germenul formează un cerc negru la limita zonei aerate.

Gelatina se lichefiază în a 10—15-a zi, înainte coloniile avînd aspect fin, pufos, datorită apariției unor numeroase ace fine, emise în unghi drept.

Serul coagulat nu este lichefiat, dar devine cu timpul transparent și friabil.

Pe mediul cu carne prăjită crește abundent, dar nu înnegrește mediul și nu digeră carnea.

Caractere biochimice și de metabolism. Este anaerob; au fost descrise de către d'Antona și variante aerobe, obținute prin treceri repetate ale tulpinilor de *Cl. tetani*, Crește între 14 și 15°, dar nu la 55°, temperatura optimă fiind 38°. Se dezvoltă bine între pH 6,5 și 8,5, optimum 8.

Considerat de majoritatea autorilor că nu atacă nici un zahar, *Cl. tetani*, după observațiile lui Prévot, atacă glucoza, maltoza, zaharoza etc. ultimele fiind consumate în cantități foarte mici. Atacarea zaharurilor este mascată aproape totdeauna de alcalinizarea simultană a mediului.

Puterea proteolitică este slabă, mai ales cea pepto- și acidaminolitică. Nu coagulează laptele și nu atacă cazeina. Produce indol și H_2S. Reduce safranina și roșul neutru. Nu reduce nitrații în nitriți, însă produce acetoină. Secretă o hemolizină (tetanolizina). Rezistența la agenți fizici și biologici este legată de rezistența sporilor acestei specii. Sporii rezistă 6 ore la 80° și 3—4 minute la 100°; sînt omorîți însă timp de 8 minute la fierbere; rezistă 20 de minute la 155° căldură uscată.

Oxiclorura de sodiu are acțiune bactericidă puternică; de asemenea, sărurile de mercur au acțiune marcată (Brewer). Desogenul (săpun de amoniu cvaternar) s-a dovedit eficace pentru sterilizarea catgutului. Aureomicina, teramicina și acidul usnic și-au dovedit activitatea și în clinică. Este sensibil la bacteriofagi specifici.

Structura antigenică. *Cl. tetani*, ca germen mobil, posedă un antigen „O”, care este comun la toate tulpinile aparținînd acestei specii, înrudit cu antigenul „O” al *Cl. tetanomorphum* — germen nepatogen — și antigene „H” specifice, care permit diferențierea a 10 tipuri serologice de *Cl. tetani*, însemnate cu cifrele romane I—X. Serotipul VI, fiind imobil, este lipsit de antigen flagelar. Serurile aglutinante au coaglutinine la titru ridicat.

Tulpinile toxice, după McLennan, sînt serotipurile II, IV, V și IX.

Studiind structura antigenică cu ajutorul metodei de fixare a complementului, Gunnisson a pus în evidență că tipurile I, III, VII și VIII se diferențiază prin antrenarea în reacție a antigenelor „H”, pe cînd tipurile II, IV, V și IX posedă, pe lîngă antigenul „O” comun, și o fracțiune somatică suplimentară.

Din punct de vedere chimic. *Cl. tetani* conține proteine specifice și o fracțiune polizaharidică nespecifică (Sindo).

Toate tipurile serologice elaborează o toxină unică, în sensul că antitoxina tetanică, obținută cu ajutorul oricărei variante de *Cl. tetani*, neutralizează toxina elaborată de oricare din aceste serotipuri (Tulloch, 1918).

Caractere de patogenitate. *Cl. tetani* este germen saprofag; oricare ar fi modul de introducere în organism, el nu invadează niciodată organismul. Rareori a fost întîlnit în viscere înaintea morții. Rămînînd cantonat la poarta de intrare, *Cl. tetani* elaborează toxina care se resoarbe în organism, determinînd sindromul tetanic.

Toxina tetanică, astfel cum este obținută din culturi, este compusă din două substanțe diferite: una, denumită tetanospasmina, determină tetanosul, iar a doua, denumită tetanolizina, hemolizează eritrocitele. Aceste două substanțe, sub acțiunea diferiților factori, se pot disocia. Prin electroforeză s-au putut de asemenea pune în evidență două fracțiuni. După Bjorklund, toxina tetanică posedă factori de grup, de specie și de tip. Toxina tetanică este profund alterată prin încălzire 30 de minute la 65°. În 1946, Pillemer a cristalizat-o, toxina cristalizată fiind de natură proteică şi electroforetic omogenă. Ea conţine 13 aminoacizi, acidul aspartic, acidul glutamic şi lizina fiind în cantităţile cele mai mari. Greutatea moleculară este de 67 286.

Toxina cristalizată este puternic antigenică şi prin tehnica Oudin s-au pus în evidenţă 5 antigene. Activitatea ei toxică este deosebit de mare; se pot obţine în funcţie de diverşi factori, toxine care conţin pe ml 400 000—500 000 DLM (cobai) sau 10 000 000—12 000 000 DLM (şoarece). Digestia triptică a toxinei tetanice scade considerabil puterea sa toxică. Ultrasunetele şi razele X diminuează activitatea toxinei; permanganatul, hipocloritul, iodul şi metionina au o puternică acţiune distructivă.

Toxina tetanică este o neurotoxină, ea nu este dermonecrotică şi nu produce leziuni vizibile ale pielii.

Activitatea ei neurotoxică se manifestă, atît asupra sistemului nervos central, cît şi asupra celui periferic. Toxina avînd o afinitate specială pentru celula nervoasă, inocularea intracerebrală este cea mai severă. Leziunile sistemului nervos central sînt reprezentate mai ales prin cromatoliza parţială perinucleară a celulelor nervoase, o metacromazie particulară şi formaţiuni microglice formînd noduli reziduali tipici. Ţesutul nervos are capacitatea de a adsorbi şi inactiva toxina tetanică. După Van Heijnigen (1961), gangliosidul creierului de bou fixează specific toxină tetanică, însă complexul este disociabil. Activitatea toxinei tetanice asupra sistemului nervos periferic pare să fie datorită unei acţiuni spastice, care se petrece la joncţiunea mioneurală a muşchiului voluntar, însoţită şi de o acţiune paralitică. Muşchiul neted, paralizat cu ajutorul toxinei tetanice, reacţionează la acetilcolină şi este sensibil întocmai ca un muşchi denervat; aceasta presupune că toxina tetanică ar avea un efect anticolinesterazic. După Van Heiningen, mecanismul neurofiziologic al acţiunii paralizante spastice a toxinei tetanice este o supresiune de inhibiţie sinapsică, care conduce la hipertoxicitatea tuturor muşchilor, toxina tetanică lucrînd asupra mediatorilor la acest nivel.

Pe de altă parte, toxina tetanică, prin activitatea ei asupra sistemului triozfosfat-dehidrogenază, intervine activ în perturbarea sintezei glicogenului în muşchiul tetanizat, ca şi a inhibării glicolizei.

Calea de propagare a toxinei în organism face şi azi obiect de discuţie; trei ipoteze sînt propuse:

1. Ipoteza emisă de Abel, prin care se susţine transportul spre centrii nervoşi ai toxinei, exclusiv pe cale sanguină şi nu prin cilindracşi, vasele limfatice şi spaţiile tisulare ale nervilor motorii periferici.

2. Ipoteza propagării toxinei prin nervi, susţinută de numeroşi autori, care se bazează pe fapte experimentale; astfel, intoxicaţia tetanică afectează direct segmentele măduvei spinării, şi nu grupa musculară interesată prin inoculare; de asemenea, secţiunea transversală a măduvei spinării în regiunea lombară împiedică moartea prin tetanos generalizat după injecţia toxinei tetanice în trunchiul sciatic.

3. În fine, ipoteza prin care, neavînd pînă azi o experienţă care să nu fie criticabilă, se consideră că toxina tetanică ajunge la centrii nervoşi pe toate căile: sanguină, limfatică, tisulară şi nervoasă.

Boala la om. După o incubaţie de 4—20 de zile în medie (cu totul excepţional după 10—12 ani), tetanosul apare sub forma unor contracţii musculare spasmodice însoţite de o hiperexcitabilitate generală. Poarta de intrare este o plagă, de obicei anfractuoasă, cu ţesuturi mortificate şi corpi străini sau o plagă chirurgicală, în special după intervenţii pe intestin. Frigul, căldura şi oboseala sînt factori favorizanţi.

Boala poate apărea sub forma tetanosului generalizat, cu temperatura 39—40°, redoarea cefii, trismus cu facies sardonic, opistotonus, pleurostotonus, emprostotonus, după tipul contracturii. Au fost descrise: tetanosul medicamentos, apărut în urma administrării parenterale de medicamente şi în special de chinină, tetanosul postoperator, cauzat de catgut, talc etc., tetanosul ombilical al nou-născuţilor, de obicei deosebit de grav, tetanos *post abortum* (după avort criminal) etc.

Boala la animale. Tetanosul spontan a fost observat şi la animale. Cîinii fac un tetanos spontan generalizat, caii fac un tetanos foarte grav. Bovinele, ovinele, caprinele şi porcinele pot, de asemenea, contracta tetanos spontan (Katic).

Boala experimentală. Unele animale nu fac tetanos experimental (broasca), altele îl fac numai în anumite condiţii (păsările). Printre animalele de laborator, şoarecele, şobolanul şi cobaiul sînt foarte sensibile, iepurele mai puţin. Cîinele este destul de rezistent.

Inocularea subcutanată sau intramusculară a 0,02 ml de cultură în bulion provoacă la cobai sau la şoarece un tetanos tipic, mortal, care începe la 10—15 ore de la inoculare, ducînd la moarte în mai puţin de 2 zile. La iepure, perioada de incubaţie este prelungită (3—8 zile), iar moartea survine a 3-a — a 10-a zi de la debut.

Imunitate. În sîngele purtătorilor umani de *Cl. tetani* din Extremul Orient s-a găsit suficientă antitoxină specifică, pentru ca 1 ml să poată neutraliza 100—500 DLM toxină (Tenbroeck). Cantităţi de antitoxină au fost găsite de acest autor şi în sîngele cobailor, ovinelor şi bovideelor purtătoare.

În ţara noastră, Condrea, Poenaru şi Dima nu au putut pune în evidenţă antitoxina tetanică naturală la cal; în schimb au pus în evidenţă aglutinine de tip „H" pentru unele serotipuri de *Cl. tetani*. Dima a confirmat existenţa imunităţii naturale la bou, bivol, oaie şi capră; ea pare legată de prezenţa sporilor tetanici în intestinul acestor animale.

Alţi autori nu au putut pune în evidenţă antitoxina în sîngele omului purtător şi chiar al bolnavilor, însă cercetările lor au fost făcute pe europeni.

În ceea ce priveşte imunitatea dobîndită în tetanos, ea este legată de folosirea anatoxinei şi serurilor hiperimune specifice.

Încă din 1909, Löwenstein imunizase cobaiul contra tetanosului cu ajutorul toxinei formolate 1/1 000, inoculată subcutanat, iar Descombey, mai tîrziu, pe cale cerebrală.

În 1925, Ramon şi Laffaille, la cobai, şi un an mai tîrziu Ramon şi Zoeller, la om, au arătat valoarea şi inocuitatea anatoxinei formolate. Ulterior s-a demonstrat că imunitatea antitetanică este transmisă de la mamă la făt.

Vaccinarea antitetanică a făcut să scadă tetanosul la răniţii vaccinaţi la $0,11\,^{0}/_{00}$ în armata engleză şi $0,0062\,^{0}/_{00}$ în armata americană (Sachs).

Scăderea tetanosului s-a constatat şi printre animalele domestice imunizate (Iugoslavia). Astăzi este admis în unanimitate că anatoxina tetanică este un antigen atît de puternic şi bine tolerat, încît folosirea lui pe scară suficient de întinsă poată să ducă la eradicarea bolii la om.

Folosirea cu succes a serului antitetanic hiperimun, obţinut azi prin administrarea de anatoxină şi eventual toxină la caii producători, şi-a făcut proba încă din primul război mondial, cînd apariţia tetanosului la răniţii trataţi cu ser antitetanic era mult scăzută, faţă de cea constatată în războiul franco-german, din 1870 şi ruso-japonez, din 1904. Puterea unui ser antitetanic este măsurată prin unităţi internaţionale antitoxice. Unitatea antitoxică internaţională este reprezentată de cantitatea cea mai mică de ser hiperimun necesară pentru a sigura supravieţuirea unui cobai de 350 g, timp de 96 de ore, contre unei doze test de toxină etalon. Aceasta din urmă trebuie să fie făcută inactivă cu ajutorul 1/10 de unitate antitoxină etalon. Dacă s-ar traduce această definiţie în raport cu Lf, 1/10 U.A. este cantitatea de ser care neutralizează exact 1/10 Lf toxină. Un ser hiperimun folosit în profilaxie sau în scop de tratament conţine de obicei 1 000 U.A.i. pe ml. Trecerea prin boală (tetanos vindecat) nu conferă imunitate. Se cunosc cazuri în care după o primă îmbolnăvire, terminată prin vindecare, să apară o a doua îmbolnăvire de tetanos (Boiron, 1961).

Tratamentul specific al tetanosului declarat

După Abel şi Chulian, serul antitetanic este incapabil să împiedice moartea, dacă ţesuturile au fixat 1 sau mai multe DLM de toxină; în tetanosul incipient, serul antitetanic are o acţiune eficace dacă este introdus într-o cantitate suficientă, care să învingă bariera vasculo-meningee (1 U.A. pe ml de sînge).

Pe de altă parte, calea de introducere joacă un rol important; după lucrările lui Falchetti, introducerea serului antitetanic pe cale intravenoasă, după o prealabilă desensibilizare, este calea de ales.

Pentru tratament s-au elaborat o serie de scheme, printre care ar putea fi amintită următoarea:

1. Cercetarea sensibilităţii la serul de cal prin test cutanat, folosind orice ser de cal diluat 1/100.
2. Desensibilizarea indivizilor hipersensibili şi folosirea antitoxinei purificate şi concentrate.
3. Dacă focarul tetanigen este necunoscut, se vor administra 60 000 U.A. pe cale intravenoasă, sub formă de perfuzie.
4. Dacă focarul (plaga) este cunoscut, se vor inocula 50 000 U. A. intravenos şi 10 000 U.A. în jurul focarului. O dată cu excizia plăgii. sub anestezie cu eter, se vor introduce 20 000 U.A. şi pe cale rahidiană.
5. În zilele următoare se administrează penicilină timp de 5 zile, însoţită de tubocurarină-retard, în cantitate de 0,6 ml, conţinînd 175 mg/ml şi mărind doza pînă la încetarea spasmelor.

Cum administrarea pe căile obişnuite a serului antitetanic nu asigură trecerea lui în creier, administrarea pe cale carotidiană este mult mai eficientă.

Ţinînd seama de marea mortalitate pe care o determină tetanosul, o serie de substanţe medicamentoase au fost încercate, printre care unele cu succes.

Curarizarea totală cu respirație artificială intermitentă cu presiune pozitivă la care se poate asocia tratamentul cu derivați ai fenotiazinei a dus la o scădere importantă a mortalității în tetanosul declarat.

Diagnosticul de laborator

Punerea în evidență a *Cl. tetani* se face de obicei greu; Miller și Rogers au pus în evidență *Cl. tetani* numai o dată pe 142 de cazuri de tetanos. Pe de altă parte, bacterioscopia plăgii unui tetanic nu oferă decît un diagnostic de prezumție dacă ținem seama că există un număr de germeni nepatogeni foarte asemănători morfologic, cum sînt: *Cl. tetanomorphus*, *Cl. sfenoides*, *Cl. tertius etc.*

Pentru a izola *Cl. tetani* din scaun și pămînt se poate utiliza procedeul Fildes:

Se însămînțează, spre pildă, 2 g materii fecale în bulion cu sînge lacat, regenerat jumătate de oră la fierbere, și se lasă în aer liber timp de 2—4 zile.

Se prelevă două picături din cultura astfel obținută și se însămînțează în lichidul de condensare al unor tuburi de geloză înclinată, adiționată de 1,5% sînge lacat de bou și 2% produse de diegstie peptică de carne. Se incubează tuburile în anaerobioză (McIntosh). *Cl. tetani* „se cațără" de-a lungul gelozei, grație mobilității sale. Se fac prelevări de la nivelul superior al culturii, obținîndu-se culturi pure.

Izolarea din puroi a țesutului excizat se face cu ajutorul trituratului obținut din aceste produse, care sînt însămînțate în medii cu carne prăjită și geloză Veillon (Hauduroy).

Totodată, din produsele astfel obținute se inoculează în laba cobailor sau șoarecilor care, datorită sensibilității lor, vor face eventual tetanos experimental, martorii primind aceleași cantități de produse inoculate pe aceeași cale, însă în amestec cu ser antitetanic.

Epidemiologie

Tetanosul este o boală mai ales rurală (Condrea); numărul cazurilor crește evident în timpul cataclismelor și mai ales în timp de război.

Incidența tetanosului și letalitatea au variat larg, după cum acestea au fost cercetate înaintea seroterapiei, după aplicarea acesteia sau după introducerea anatoxinei specifice în scop profilactic.

Dacă înaintea seroterapiei se întîlnea o incidență de 10 la 1 000 de răniți, după aceasta incidența a scăzut mult, pentru ca, pe o colectivitate corect vaccinată cu anatoxină, morbiditatea să devină practic nulă.

Aceleași fapte de observație se întîlnesc și în letalitate: de unde înaintea seroterapiei se constatau 80—90% cazuri letale în tetanosul declarat, după seroterapie letalitatea a scăzut cu mai mult de jumătate (40%).

În condițiile actuale de profilaxie, întreaga acțiune pentru eradicarea tetanosului are ca esență ridicarea stării imunobiologice a populației prin mijloace specifice.

Conduita profilactică a epidemiologului diferă, după cum este vorba de o colectivitate predispusă acestei boli, sau de răniţi. Pentru colectivităţile predispuse (armata, muncitorii agricoli etc.), folosirea la timp a vaccinării cu anatoxină tetanică constituie măsura cea mai eficace pentru înlăturarea bolii.

Pentru răniţi, conduita profilactică trebuie să fie următoarea: inocularea imediată a unei cantităţi de 1 500 U.A. (ser) pe cale subcutanată, şi după 4 zile, inocularea repetată de cantităţi crescînde de anatoxină tetanică, începînd cu 1 ml şi terminînd cu 6 ml, pînă plaga este complet vindecată. Inoculările se fac la interval de 6—7 zile. Această conduită trebuie aplicată chiar la persoanele vaccinate, a căror anamneză este îndoielnică.

Pentru înlăturarea tetanosului nou-născuţilor, vaccinarea gravidelor în luna a VII—VIII-a de sarcină se impune, anticorpii trecînd prin placentă şi fiind găsiţi în cantităţi suficiente, în sîngele fătului, timp de cel puţin o lună.

Clostridiile gangrenei gazoase şi complicaţii gangrenoase ale plăgilor

Definiţie. Gangrena gazoasă este o toxiinfecţie gravă, cauzată de o asociaţie de germeni anaerobi şi aerobi, caracterizată cel mai adesea printr-un edem care se instalează rapid, însoţit de necroza ţesuturilor şi formare de gaz.

După cum se vede, este vorba de o complicaţie polimicrobiană a plăgilor.

Agenţii anaerobi patogeni cauzatori ai acestei toxiinfecţii sînt numeroşi, incidenţa lor în complexul florei anaerobe variind după autori.

Redăm în tabelul LXVIII numele germenilor, procentajul şi numele unor autori care s-au ocupat de această problemă (după Dible şi Mac Lennan, 1951).

Tabelul LXVIII

Denumirea germenilor	Mac Lennan	Smith	Stock	Schultz	Zeissler
	(199 de cazuri	(110 cazuri)	(30 de cazuri)	(45 de cazuri)	(133 de cazuri)
Cl. perfringens	72 %	39 %	80 %	73 %	64 %
Cl. oedematiens	37 %	32 %	50 %	57 %	63 %
Cl. septicum	18 %	0 %	3 %		21 %
Cl. histolyticum	6 %	0 %	0 %	0 %	1 %
Cl. bifermentans	10 %	54 %	23 %	10 %	21 %
Cl falax	1 %	3 %	10 %	0 %	0 %

Germenii aerobi de asociaţie sînt streptococii, stafilococii, germenii din genurile *Proteus* şi *Eschericha*, bacilii difteroizi etc.

În acest capitol vom descrie numai agenții care sînt mai frecvent întîlniți și cu patogenitate crescută.

Clostridium perfringens

Sinonime: *Cl. welchii*; *Welchia perfringens*; bacilul *Achalme*; *B. aerogenes capsulatus*; *B. phlegmonis emphysematosae* etc.

Istoric. *Cl. perfringens* a fost izolat de la cadavre, de către Welch și Nutall, în 1892. Ca urmare a lucrărilor lui Wilsdon, care a studiat factorii toxici în filtratele de cultură de *Cl. perfringens*, precum și ale lui Dalling, Mc Ewen, Glenny, Oakley etc. *Cl. perfringens* este clasificat azi în 6 subtipuri toxigene, denumite A, B, C, D, E și F.

Habitat. *Cl. perfringens* este germenul anaerob patogen cel mai răspîndit. A fost întîlnit în aer, în praf, în sol, în ape de canal, în fecale, în lapte, pe legume etc. A fost întîlnit, de asemenea, în cavitățile naturale și patologice ale omului și animalelor: gură, intestin, vagin, cavități pleurale, caverne tuberculoase etc. Patocka l-a găsit în catgut și caria dentară.

Caractere morfologice. Bacil scurt și gros, cu capete ușor rotunjite, apare în perechi, așezați unul în prelungirea celuilalt, formînd deseori un unghi ascuțit. În culturile vechi se arată filamentos. Biometrie: 4—8 μ /0,8—1,2 μ. Imobil, capsulat și sporulat.

Mediile acide și clorura de calciu împiedică sporulația (Broșteanu); cultivarea *Cl. perfringens* în prezența *B. fecalis alcaligenes* permite cu ușurință punerea în evidență a sporilor; gram-pozitiv; culturile vechi devin gram-negative.

Caractere de cultură. Pe medii lichide, bulion, crește bine și tulbură uniform mediul. În bulion glucozat 2‰, *Cl. perfringens* cultivă abundent, cu producerea unei mari cantități de gaz, cu miros butiric.

Pe medii solide crește ușor. În geloza în coloană se dezvoltă cu mare degajare de gaz, fragmentînd mediul. Coloniile izolate sînt biconvexe, lenticulare, cu contur bine delimitat.

Geloza în suprafață oferă colonii rotunde, circumscrise, cu un centru opac. Pe geloză cu sînge coloniile sînt înconjurate de o zonă de hemoliză.

Caractere biochimice și de metabolism; anaerob; crește bine la 22°; temperatura optimă 37°. Poate crește la 50°, dar nu la 55°.

Atacă rar și slab gelatina și serul coagulat. Laptele este coagulat în masă și rapid, cheagul se retractă și bulele de gaz sapă în cheag o serie de cavități, care îi dau aspectul unui burete.

Unele tulpini produc indol. Produce o lipază care saponifică grăsimile. Elaborează o hemolizină activă. *Cl. perfringens* posedă și un factor hemaglutinant pentru hematiile umane și animale; produce H_2S; reduce roșul neutru, turnesolul și sulfo-indigotatul de sodiu. Reduce, de asemenea, nitrații în nitriți. *Cl. perfringens* fermentează totdeauna glucoza, galactoza, lactoza, zaharoza, maltoza, manoza, amidonul, dextrina și glicogenul. După cum fermentează inulina și glicerina, *Cl. perfringens* a fost împărţit în 4 grupe fermentative. Produce acroleină pe seama glicerolului. Acţiunea sa fermentativă a fost utilizată în industria brînzeturilor şi panificaţie.

Rezistenţa. Vitalitatea formei vegetative este slabă. Sporii *Cl. perfringens* sînt de obicei omorîţi la fierbere, în puţin timp (5 secunde); face excepţie tipul toxigen F, sporii acestuia rezistînd la această temperatură mai bine de 2 ore. Sporii sînt rezistenţi la aer, iar cei uscaţi rezistă chiar la 130°. Rezistenţa sporilor creşte în prezenţa altor anaerobi, a căror rezistenţă este mai mare decît a *Cl. perfringens* (*Cl. sporogenes*). Sensibil la sulfamide, marfanil şi antibiotice (penicilină, aureomicină şi cloromicetină). Sensibil la bacteriofag.

Structură antigenică. Se ştie că *Cl. perfringens* conţine mai multe tipuri serologice şi că nu există totdeauna o corelaţie între rezultatele obţinute prin reacţia de aglutinare şi reacţia de fixare a complementului cînd aceasta este practicată cu antigene de natură polizaharidică (concordanţa este existentă pentru tipul A, însă nu pentru tipurile D şi F).

Pe de altă parte, nu există o corelaţie între tipurile serologice şi tipurile toxigenice ale *Cl. perfringens*.

Antigenul „O", prezent în formele „S" de *Cl. perfringens*, este deosebit după tulpina şi tipul toxigen căruia ne adresăm; astfel, antigenul „O" al tipului toxigen A este specific de tulpină, pe cînd antigenul „O" al tipurilor toxigene B şi C sînt respectiv comune. Pe de altă parte, pe lîngă antigenele „O" termostabile există şi antigene „O" termolabile, care sînt absente la tulpinile care posedă toxina ε (tipul B şi D). Aceste constatări fac din metoda aglutinării o metodă inaplicabilă la clasificarea tulpinilor de *Cl. perfringens*.

Ool tip A sp
Od tip B C

Caractere de patogenitate. *Cl. perfringens*, în opoziţie cu majoritatea clostridiilor patogene, are o mare capacitate de invazie şi de adaptare în organismele invadate. Acest aspect de virulenţă se întîlneşte cu predilecţie în anumite forme clinice ale gangrenei gazoase.

Dar caracterul său esenţial de patogenitate este constituit de toxigeneză, toxinele tipurilor toxigenice de *Cl. perfringens*, cunoscute pînă azi, fiind cel puţin 11. Numărul mare de toxine a determinat pe Oakley să le fixeze o nomenclatură, folosindu-se de alfabetul grec.

Caracteristicile acestor toxine sînt următoarele:

1. Toxina α este o lecitinază care omoară şoarecele pe cale intravenoasă, produce necroza pielii cobaiului, hemolizează hematiile de oaie, nu este activă decît în prezenţa ionilor de Ca^{++}, tulbură serul uman normal (Nagler) şi ovolecitina, pe care o dedublează în fosforilcolină şi o steatooleilgliceridă. Este neutralizată de serul antitoxic. Toxicitatea generală a toxinei *Cl. perfringens* este datorită esenţial toxinei α; ea scindează legăturile glucozidice ale acidului hialuronic şi atacă mucoizii şi mucinele.
2. Toxina β este o toxină termolabilă, letală şi dermonecrotică. Sub acţiunea tripsinei devine inactivă.
3. Toxina γ este o toxină letală, dar nehemolitică.
4. Toxina δ posedă numai acţiune hemolitică.
5. Toxina ε are efect letal şi necrozant, este termostabilă; cu ajutorul tripsinei devine mult mai toxică.
6. Toxina η este o toxină letală, care nu este nici necrozantă, nici hemolitică.

7. Toxina 0 este o hemolizină termolabilă, oxigenlabilă, însă nu este necrozantă.

8. Toxina ι este letală și necrozantă.

9. Toxina ϰ se manifestă ca o colagenază.

10. Toxina λ este o gelatinază.

11. Hialuronidaza (factor de invazie) nu este prezentă la toate tulpinile de *Cl. perfringens*.

Pe baza prezenței unora sau altora din aceste toxine în filtratele de cultură a diferitelor tulpini de *Cl. perfringens*, de proveniență diferită, s-au putut deosebi 6 tipuri toxigenice de *Cl. perfringens*, denumite A, B, C, D, E, F. Fiecare din aceste tipuri sînt capabile să dea anumite boli la om și animale, după cum se vede din tabelul LXIX

Tabelul LXIX

Tipul toxigen	Toxine										Boala care o determină
	α	β	γ	δ	ε	η	0	ι	ϰ	λ	
Cl. perfringens tip A	+++	−	−	−	−	+	+	−	+	−	gangrenă gazoasă
Cl. perfringens tip B	+	+++	+	±	+	−	±	−	−	+	dizenteria mieilor
Cl. perfringens tip C	+	+++	+	++	−	−	±	−	+	−	enterotoxemia oilor
Cl. perfringens tip D	+	−	−	−	++	−	±	−	±	±	enterotoxemia oilor
Cl. perfringens tip E	+	−	−	−	−	−	+	+	+	+	enterotoxemia vițeilor
Cl. perfringens tip F	+	++ +	+	−	−	−	−	−	−	−	enterita necrozantă umană

Cl. perfringens tip A, agent al gangrenei gazoase, posedă ca toxină principală factorul α, care de fapt este o lectinază, prin urmare o enzimă (Mc Farlane și Knight). Toxina α este relativ termostabilă, activată prin Ca^{++} și inactivată prin fosfați. Guillaumie i-a pus în evidență termoregenerarea.

Sub acțiunea oxigenului, care determină o denaturare de suprafață, toxina α își pierde repede din activitate.

Introdusă în piele, provoacă leziuni ireversibile la 30 de minute de la inoculare, necroza fiind datorită hidrolizei lecitinei din țesuturile pielii; același mecanism intervine și în omorîrea culturilor de țesuturi.

Toxina α a *Cl. perfringens* este capabilă să determine opalescența serurilor umane și a maimuțelor superioare (reacția Nagler), fenomenul fiind datorit aceluiași mecanism. Opalescența este împiedicată în prezența serului anti-α.

Raportul între activitatea intradermică și cea letală a toxinei a fost pusă în evidență, încă din 1934, de către Glotova, Velikanov și Selevinskaia, iar metoda lor de lucru a fost adoptată de către Iensen la Copenhaga şi Bortwick în Germania.

Alături de toxina α, se întîlneşte şi factorul 0, hemolizină oxigen-labilă, dar reactivată cu ajutorul reductorilor. Este înrudită antigenic cu streptolizina, pneumolizina şi tetanolizina.

Alături de aceşti doi factori α şi 0, filtratele de cultură ale *Cl. perfringens* mai posedă un constituent antigrupal (enzimă cu acţiune asupra aglutinogenului A din hematiile umane), leucocidina şi o pseudotoxină neantigenică şi neinactivată de către serul antitoxic perfringens.

Infecţia experimentală. Cobaiul este animalul de ales pentru infecţia experimentală. Este suficientă o cantitate de 1/10 ml de cultură în bulion glucozat, administrat pe cale intramusculară, pentru a duce la moartea animalului în 12—48 de ore. La locul de inoculare se formează un flegmon gazos, cu căderea părului pe întreaga zonă afectată.

La palpare se simte crepitaţia caracteristică. La nivelul muşchilor se constată o mioliză intensă, aponevroze friabile, vase rupte, toate plutind într-o serozitate roşiatică, unde germenii microbieni sînt extrem de numeroşi. Infecţia se generalizează mai totdeauna înaintea morţii, germenii microbieni găsindu-se în cavitatea peritoneală, ficat, splină, miocard, rinichi.

Şoarecele este foarte sensibil; introducerea de 0,5 ml pe cale intravenoasă duce la moartea animalului în cîteva minute, uneori cu hemoglobinurie sau epistaxis.

Iepurii sînt mai puţin sensibili; inocularea subcutanată oferă mari diferenţe individuale.

Dintre păsări, porumbelul este deosebit de sensibil; de altfel, studiile iniţiale asupra toxinei *Cl. perfringens* au fost efectuate cu ajutorul acestui animal (Bull şi colaboratorii).

Imunitate. Weinberg şi colaboratorii, cercetătoarea sovietică Selevinskaia şi alţi cercetători au obţinut imunizarea animalelor cu ajutorul anaculturilor de *Cl. perfringens*; de asemenea, cu ajutorul anatoxinei (toxina formolată şi menţinută pînă la detoxifiere la 38°), se obţin anticorpi specifici la animalele inoculate.

Metoda hiperimunizării cailor cu anatoxină în lanolină, urmată de toxină centrifugată, preconizată de Nestorescu şi Theodorescu, este foarte eficace; în raport cu aspectele individuale ale animalelor, serurile pot titra de la 180 la 350 U. I. fără să se constate acidente (Prévot).

Imunizarea specifică a omului cu ajutorul anatoxinelor monovalente şi polivalente adsorbite pe alaun contra *Cl. perfringens* a fost obţinută de către diferiţi autori; în ţara noastră, studii importante similare au fost efectuate de către Olaru şi Bittner (1960).

Clostridium oedematiens

Sinonime: *Cl. novyi*; *B. oedematis maligni II.*

Istoric: *Cl. oedematiens maligni II*, descris de către Novy în 1891, a fost izolat şi studiat în timpul primului război mondial de către Weinberg şi Séguin. Un germen asemănător a fost descris, în 1929, de către Zeissler şi

Raszfeld sub numele de *B. gigas*, iar în 1930, Kraneveld prezintă un germen asemănător drept agent etiologic al ostemielitei bivolilor.

Scott propune denumirile de A, B și C, respectiv pentru *Cl. oedematiens*, *B. gigas* și *bacilul Kraneveld*.

Habitat. *Cl. oedematiens* a fost întîlnit în sol și în intestinul animalelor.

Caractere morfologice : bacil gros, cu capete rotunjite, lung de 4—14 μ și gros de 0,8—1 μ, se înfățișează izolat sau în lanțuri de 2—3 indivizi, drept sau ușor incurbat. În cultură apare sub forma literelor C sau S.

Ciliat, posedă cel puțin 20 de cili lungi și flexuoși. Mobilitatea germenului nu poate fi constatată în anaerobioză strictă ; în puroi și în mediile de cultură apare imobil.

Germen sporulat, sporii sînt ovalari subterminali. Apariția lor în medii de cultură este maximă în culturi în vîrstă de 5—6 zile.

Este gram-pozitiv, dar în culturile vechi pierde repede această proprietate.

Caractere de cultură. Pe medii lichide, *Cl. oedematiens* mai întîi tulbură și ulterior aglutinează spontan, formînd un depozit la fundul tubului, lichidul supernatant devenind clar. Această claritate a bulionului se explică și prin degenerescență rapidă a microbilor, depozitul fiind format mai ales din spori. Degajează un miros fetid, caracteristic.

Pe bulion de ficat de oaie, peptonat 2%, se dezvoltă rapid, cu mare degajare de gaz. Pe geloză în coloană, pe care deseori o fragmentează, coloniile izolate împrumută uneori aspect de grenadă ; cele mai multe, însă, prezintă un centru opac, gălbui, înconjurat de o coroană de filamente scurte și inegale, care se văd bine cu lupa.

Caractere biochimice și de metabolism. Anaerob strict. Temperatura optimă de creștere 37°. Crește la 22°, ca și la 55°. Slab proteolitic. Coagulează laptele tardiv, cheagul dizolvîndu-se în grunji fini. Nu lichefiază totdeauna gelatina ; serul coagulat și fragmentul de albuș de ou din mediu nu sînt nici lichefiate, nici coagulate. Bulionul de carne oferă o cultură mediocră, dar carnea capătă o culoare alburie. Nu produce indol și H_2S. Reduce albastrul de metilen. Virează slab bulionul cu roșu neutru. Slab zaharolitic. Unele tulpini atacă glucoza, levuloza și maltoza, xiloza și amidonul solubil, altele atacă glicerina, levuloza, dextrina.

După cum atacă sau nu glicerolul, după cum elaborează sau nu toxină, și după cum determină anumite infecții la om și animale, Scott și Turner au descris tipurile A, B, C (vezi tabelul LXX).

Tabelul LXX

Tipul	Glicerolul	Toxina	Origine
A	+	+	gangrenă gazoasă la om
B	—	+	gangrenă gazoasă la oi
C	—	—	ostemielita bivolilor

Cl. oedematiens elaborează o hemolizină activă pentru eritrocite de om și oaie. Nu posedă catalază.

Rezistență. Sporii sînt rezistenți la căldură. Supraviețuiesc 30 de minute, la 100°. Sensibil la antibiotice (penicilină).

Structura antigenică a fost bine studiată de către Turner, care s-a ocupat de caracteristicile antigenelor ,,H'' și ''O''. Antigenul ,,H'' este specific tipurilor A, B și C, pe cînd antigenul ,,O'' este comun la toate aceste tipuri, diferențiindu-se numai cantitativ.

Caractere de patogenitate. Filtratele toxice de *Cl. oedematiens* conțin 6 factori, care au fost desemnați de către Oakley α, β, γ, δ, ε și λ, precum și o hialuronidază.

1. Toxina α este letală pentru șoarece și dermonecrotică pentru cobai.
2. Toxina β este o lecitinază, hemolitică și dermonecrotică.
3. Toxina γ este o lecitinază numai hemolitică.
4. Toxina δ are o activitate hemolitică, însă această acțiune este oxigen-labilă.
5. Toxina ε determină, ca și toxina α de *Cl. perfringens*, opalescența lecitovitelinei; ea este responsabilă și de aspectul perlat al coloniei, cînd este însămînțată pe mediu cu lecitovitelină (reacția Hayward).
6. Toxina λ este o hemolizină activă.

Aceste toxine sînt diferit reprezentate în diversele tipuri de *Cl. oedematiens*. Redăm în tabelul LXXI repartiția acestor toxine (după Oakely, Warrack și Clarke).

Tabelul LXXI

Toxina	Tipurile de *Cl. oedematiens*		
	A	B	C
α	+	+	−
β	−	+	−
γ	+	−	+
δ	+	−	−
ε	+	−	−
λ	−	+	−

Infecția la animale. *Cl. oedematiens* poate cauza la oi hepatita necrozantă, cunoscută în Austrialia sub numele de *black-disease*. Boala este caracterizată prin necroza hepatică, degenerescențe și exsudat pericardic gelatinos. Hepatita necrozantă a fost semnalată în diferite părți ale lumii de către numeroși autori, printre care și de medicii veterinari romîni, Cernăianu și Mihăilescu. Boala a mai fost semnalată la cal și la broaște țestoase, în afară de mamiferele domestice, ale căror plăgi accidentale pot fi complicate prin contaminare cu acest agent infecțios.

Infecția experimentală. Cultura de *Cl. oedematiens* poate omorî cobaiul, iepurele, șobolanul, șoarecele, precum și animalele mari, ca oaia și calul. Cobaiul este cel mai sensibil. Dacă i se inoculează pe cale intramusculară o cantitate de 1 ml de cultură, în raport cu toxigenitatea mai mare sau mai mică a tulpinii, se constată o tumefacție apreciabilă a membrului inoculat, care crește cu fiecare oră. Pielea este palidă, iar edemul este lemnos și invadant. La incizie se constată un edem gelatinos, albroz și fără infiltrație gazoasă. Nu se constată necroza mușchilor, și nici nu degajează miros putrid. În serozitate germenii sînt rari, imobili și nu invadează organismul. Iepurele este mai puțin sensibil. Leziunile sînt asemănătoare cu cele observate la cobai, însă edemul roz-alburiu este însoțit și de fine bule de gaz.

Șoarecele alb este extrem de sensibil : o cantitate de 1/50 ml cultură este suficientă să determine moartea animalului în 48 de ore, cu leziuni caracteristice.

Imunitate. Anaculturile s-au dovedit foarte eficace în profilaxia hepatitei necrozante (Cernăianu). Transformarea toxinei *oedematiens* în anatoxină a fost obținută încă din 1924 (Weinberg și Prévot).

În serul oamenilor adulți se găsește antitoxină normală (Nestorescu). Cu anatoxine active se poate obține la om o imunitate puternică.

Inocularea la o lună interval, în două rînduri, poate duce la imunizarea a 75% din indivizi ; dacă se adaugă o injecție de rapel, 5—6 luni mai tîrziu, proporția de indivizi vaccinați atinge 90% (Prévot).

Hiperimunizarea cailor cu ajutorul anatoxinei *Cl. oedematiens* se obține ușor. Serul anti-*Cl. oedematiens* este un ser activ. Tratamentul infecției experimentale cu *Cl. oedematiens* se bazează pe seroterapie, dacă aceasta este administrată pe cale intravenoasă. Infecția la om, în complexul gangrenei gazoase, este de asemenea susceptibilă de seroterapie, mai ales dacă se adaugă chimioterapia și în special antibioticele.

Clostridium septicum

Sinonime : vibrion septic (Pasteur, 1877) ; *Cl. oedematiens maligni* ; *Oedembacillus* ; *B. oedematiens maligni*.

Istoric : a fost izolat în 1877, de către Pasteur și Jaubert, din sîngele putrefiat al unei vaci. Completări la studiul acestui germen au fost aduse, rînd pe rînd, de către Koch, Gohn și Weinberg, ultimul în timpul primului război mondial.

Habitat : foarte răspîndit în natură, se găsește mai ales în sol, bălegar și intestinul ierbivorelor. A fost întîlnit și în catgut (Cuboni).

Caractere morfologice : bacil cu extremități rotunjite, mai subțire decît *Cl. perfringens*, 2—5 μ lungime, 0,6—0,8 μ grosime. În culturi vechi prezintă forme filamentoase, deseori degenerate, sau forme în navetă. Ciliat, prezintă o mobilitate evidentă, atît în exsudate, cît și în culturi tinere. Cilii sînt numeroși, peritrichi. *Cl. septicum* este puternic sporulat, sporul fiind central sau subterminal. Sporulația este favorizată de mediile alcaline și bogate în substanțe proteice.

Cl. septicum este Gram-pozitiv.

Caractere de cultură. Pe medii lichide, spre pildă, bulion, culturile sînt abundente, tulburînd omogen și depunînd ulterior ; pe bulion glucozat se produce o degajare mare de gaz și acidificarea mediului. Culturile în bulion-sînge determină lacarea hematiilor însoțite de o intensă sporulație.

Apa peptonată oferă o cultură slabă.

Pe medii solide, de exemplu, pe geloză în coloană, coloniile prezintă un aspect de floare de păpădie, cu un centru opac, mediul fiind fragmentat.

Sub influenţa tripaflavinei au fost obţinute colonii lipsite de coroana arborescentă, care conţin germeni cu calităţi de metabolism, antigenice şi de patogenitate deosebite (Nestorescu şi Theodorescu).

Pe geloză-sînge, în suprafaţă, se pun în evidenţă colonii transparente sau slab opalescente, bine circumscrise, înconjurate de o zonă de hemoliză.

Pe gelatină coloniile sînt fine şi cu aspect de vată; gelatina este lichefiată lent.

Caractere biochimice şi de metabolism. Anaerob, puţin pretenţios. Creşte bine la 37°, poate creşte şi la 55°. Fermentează glucoza, levuloza, galactoza, maltoza, lactoza şi salicina. Nu produce indol şi H_2S. Produce o enzimă gelatinolitică, activă la pH 7,8. Decolorează laptele turnesolat în 24 de ore şi coagulează tardiv, fără digestie.

Decolorează roşul neutru, albastrul de metilen şi sulfo-indigotatul de sodiu. Reduce nitraţii în nitriţi. Produce amoniac şi acetonă.

Elaborează o hemolizină activă, care este însă foarte sensibilă la căldură (distrusă în 30 de minute la 75°), precum şi o hemoaglutinină pentru hematiile de iepure şi cobai (Nicolle).

Rezistenţă. Formele vegetative de *Cl. septicum* pier la 60° şi în contact cu oxigenul. Sporii trăiesc la 90°. Este puţin sensibil la antibiotice şi sulfamide.

Structura antigenică. Ca germen ciliat, *Cl. septicum* conţine două aglutinogene: „H" termolabil şi „O" termostabil. Antigenul „O" determină apariţia de anticorpi protectori; el este responsabil şi în reacţia de fixare a complementului.

Cu ajutorul reacţiei de aglutinare, Robertson şi Davesne au putut să obţină 6 tipuri serologice individualizate.

Structura antigenică a *Cl. septicum* a putut fi cunoscută, aşa cum se exprimă Prévot, de la lucrările lui Nestorescu şi colaboratorii săi. Adăugînd la medii de cultură tripaflavină, care favorizează disociaţia acestui germen, Nestorescu a obţinut două variante stabile: una din aceste variante este ciliată, dînd colonii pufoase şi producînd o exotoxină solubilă; cealaltă variantă dă colonii granulare şi este atoxigenă. Cele două variante produc o hemolizină. Exotoxina variantei ciliate este termolabilă şi floculează în prezenţa serurilor antitoxice şi antimicrobiene în acelaşi timp. Virulenţa germenilor poate fi exaltată prin adăugare de mucină şi gălbenuş de ou. Punerea în evidenţă a antigenului flagelar a fost realizată prin metoda serologică, întrebuinţînd suspensii bacteriene tratate prin formol şi cloroform. Antigenul somatic de natură glucidolipidică este prezent în amîndouă variantele şi identic serologic. Plecînd de la autolizatul bacterian al celor două variante, Nestorescu şi colaboratorii au pus în evidenţă o proteină precipitabilă la pH 4,2 specifică fiecărei variante.

Cl. septicum are antigene comune cu *Cl. chauvoei*.

Caractere de patogenitate. *Cl. septicum* elaborează 2 componente toxice: una letală sau nehemolitică şi cealaltă, o hemotoxină.

Toxina nehemolitică nu are acţiune dermonecrotică pentru cobai, însă conţine un factor hemaglutinant. În prezenţa oxigenului este lent inactivată şi substanţele reductoare (cisteina) nu îi restituie activitatea.

Toxina *Cl. septicum* este constituită din mai mulţi factori . Factorul β al acestei toxine este o dezoxiribonuclează. Ea mai posedă un antigen

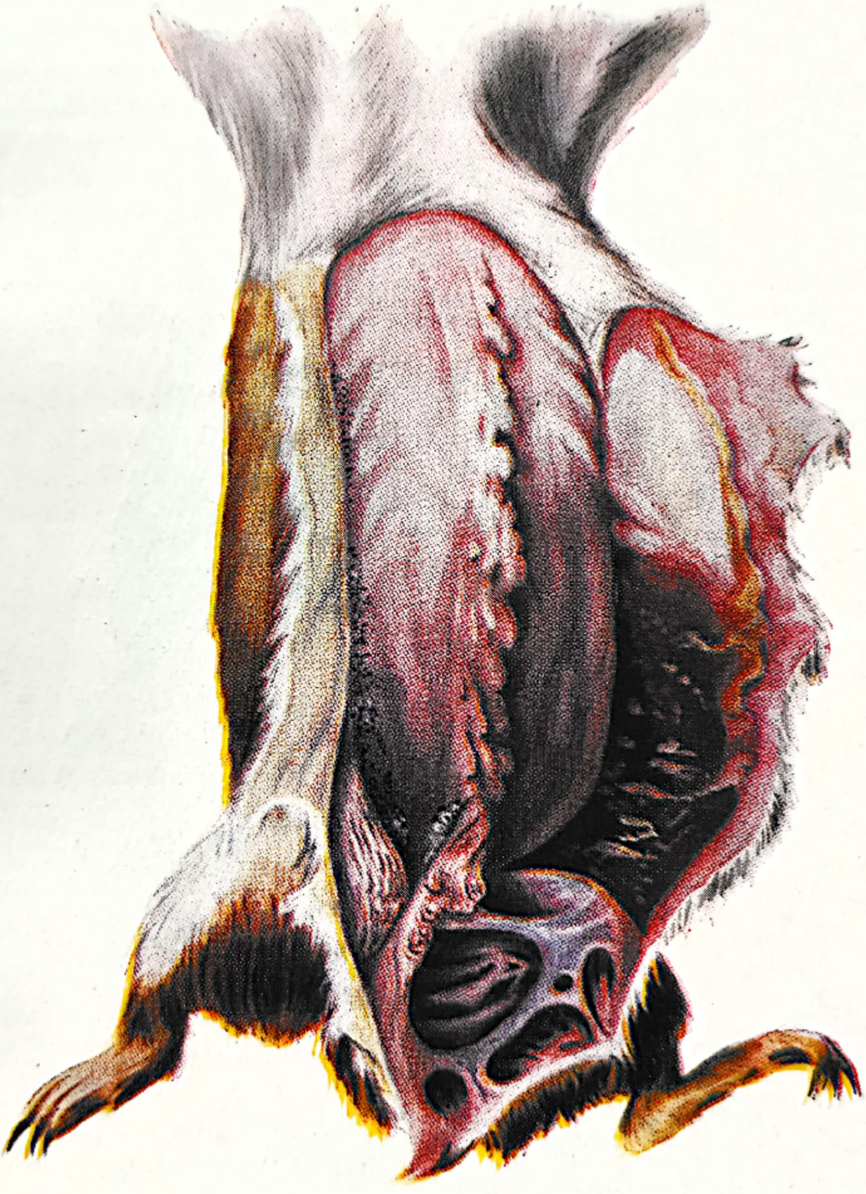


Fig. 138. — Cobai inoculat cu *Cl. perfringens.*

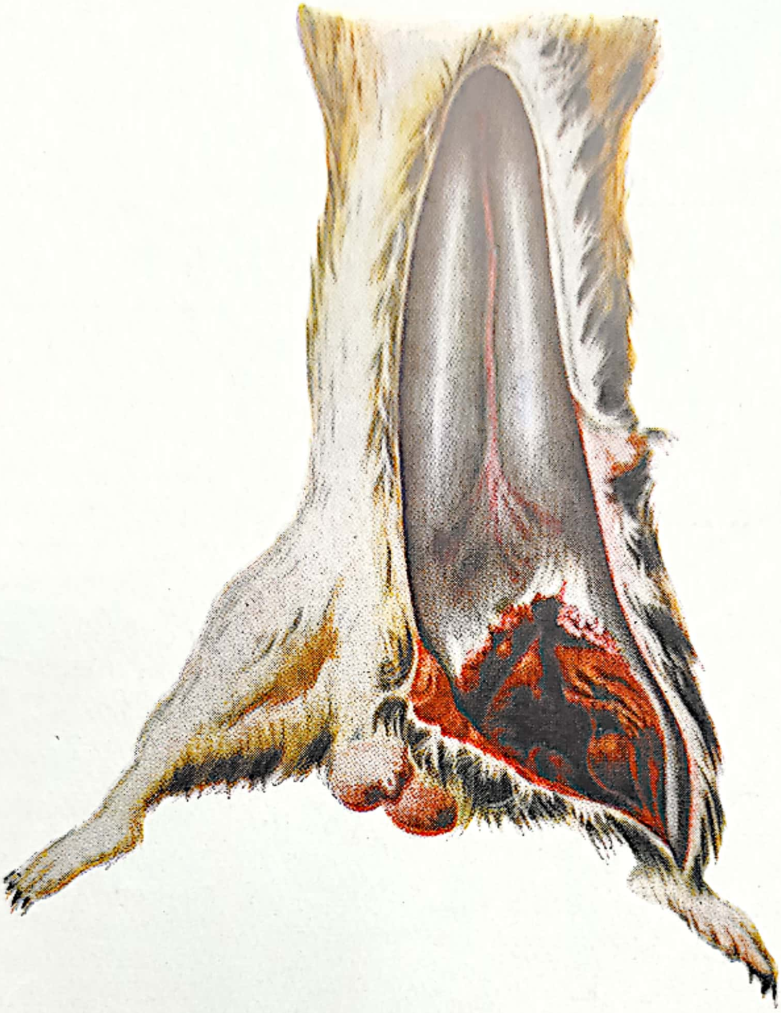


Fig. 139. — Cobai inoculat cu *Cl. oedematiens.*

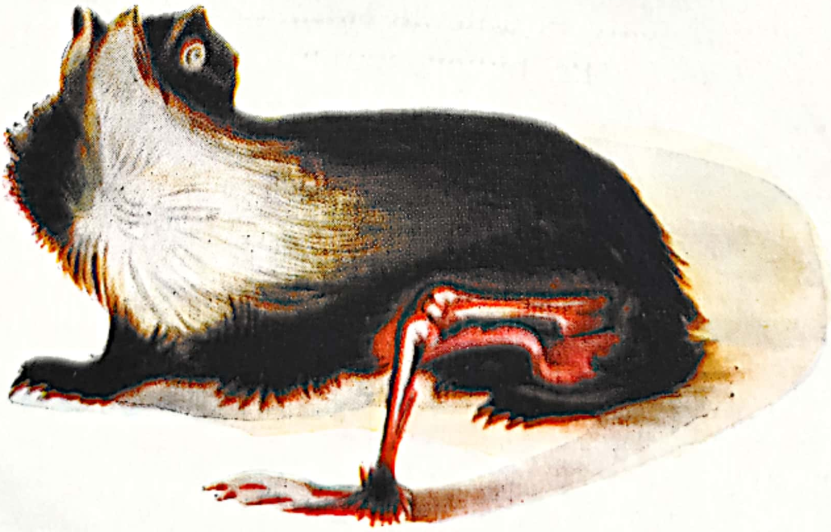


Fig. 140. — Cobai inoculat cu *Cl. histolyticum.*

comun cu *Cl. histolyticum*, ca și o pseudotoxină nespecifică, cu intensă capacitate de vasoconstricție, care provoacă edem pulmonar și eliberarea de histamină.

Din celulele desintegrate de *Cl. septicum* s-a putut extrage o toxină specifică care este neutralizată numai de serul antivibrion septic (factorul β).

Infecția experimentală. *Cl. septicum* este foarte patogen pentru animalele de laborator. Animalele cele mai sensibile sînt : cobaiul, șobolanul, șoarecele alb și iepurele ; inocularea cobaiului cu 1/10—1/30 ml de cultură de 48 de ore, duce rapid la moartea animalului, cu escară umedă la locul de inoculare și edem crepitant, însoțite de imobilitate și stupoare. La autopsie se găsește edem hemoragic cu serozitate sanguinolentă în cavități.

Imunitate. Pusă în prezența formolului și a temperaturii convenabile, toxina *Cl. septicum* se transformă în anatoxină activă. Bernheimer, iar în țara noastră Bittner au obținut anatoxine capabile să vaccineze puternic animalele.

Hiperimunizarea calului, practicată cu administrare de anatoxină și ulterior cu toxină, poate pune la dispoziție seruri antitoxice puternice. Serul anti-*Cl. septicum* neutralizează și factorul letal al *Cl. histolyticum* (Guillaumie și colaboratorii ; V. Ștefănescu și colaboratorii).

Clostridium histolyticum

Istoric. A fost descoperit în flora gangrenei gazoase a omului, în 1917, de către Weinberg și Séguin.

Habitat. Este prezent în sol și în intestinul omului și animalelor.

Caractere morfologice. În serozitățile patologice și în culturile tinere, *Cl. histolyticum* apare ca un diplobacil cu extremități rotunjite, drept sau ușor incurbat ; dimensiuni : 3—5 μ lungime pe 0,5—0,8 μ grosime. Ciliat (mai mult de 20 de cili), prezintă o mobilitate accentuată în serozitățile patologice și culturi tinere.

Sporii ovalari, rar centrali, sînt mai totdeauna subterminali, dezvoltîndu-se ușor în mai toate mediile de cultură ; gram-pozitiv.

Caractere de cultură. Pe bulion simplu, *Cl. histolyticum* tulbură omogen și formează un depozit pulverulent, mediul limpezîndu-se. Pe bulion-ou crește bine și digeră complet cubul de albuș de ou.

Pe geloză în coloană crește abundent, coloniile înfățișîndu-se cu un nucleu central și filamente periferice ramificate, de tip arborescent.

Pe gelatină, înainte de a o lichefia, formează colonii arborescente.

Caractere biochimice și de metabolism. Anaerob, microaerofil. Crește la 22° ; temperatura optimă 37° ; nu crește la 50°. pH optim 6—8,9. *Cl. histolyticum* posedă o intensă proprietate proteolitică ; el lichefiază ușor gelatina, ovalbumina, cazeina , serul coagulat. Cultura totală digeră mușchiul crud sau încălzit la 60° ; nu digeră mușchiul fiert.

Produce urme de indol în apă peptonată. Desface proteinele pînă la stadiul de aminoacizi. Pe de altă parte, *Cl. histolyticum* posedă o putere fibrinolitică pronunțată, ca și o înaltă activitate colagenazică.

Laptele turnesolat este decolorat în 2—4 zile și coagulat. Digestia cheagului se face rapid și complet. *Cl. histolyticum* are o putere zaharolitică nulă sau foarte slabă. Acest germen poate fermenta , fără gaz, glucoza, levuloza, maltoza, lactoza și xiloza.

Produce H_2S în cantitate mică, reduce roșul neutru, reduce nitrații în nitriți. Produce amoniac și acetoină.

Unele tulpini produc hemotoxine pentru hematii de om, oaie și cobai.

Rezistența la agenți fizici, chimici și biologici. *Cl. histolyticum* prezintă o vitalitate marcată, deși sporii nu rezistă mai mult de 20 de minute la 110°. Rezistența sporilor variază după tulpini; în general ei sînt distruși în 60 de minute la fierbere. Antisepticele acționează slab. Teramicina, aureomicina, cloromicetina și penicilina sînt active contra acestui germen.

Structura antigenică. După Weinberg și Séguin, există mai multe tipuri serologice de *Cl. histolyticum*. Smith a observat că serurile aglutinante preparate cu *Cl. histolyticum* forma „S" aglutinează formele „S" și „R", pe cînd serul aglutinant preparat cu forma „R" nu aglutinează forma „S"; mai mult, serul anti- „S" aglutinează și *Cl. sporogenes* — oaspete obișnuit al plăgilor complicate — ceea ce arată că este vorba de o relație genetică între aceste două specii.

S-a putut pune în evidență la forma „S" un polizaharid complex, care pare că formează antigenul de suprafață al *Cl. histolyticum*.

Caractere de patogenitate. *Cl. histolyticum* elaborează o toxină complexă, căreia Oakley și Warrack i-au putut pune în evidență 3 factori toxici, și anume:

— componenta α, care este o toxină letală și necrozantă;

— componenta β, care este o colagenază, studiată bine de Evans, iar în țara noastră de Nestorescu și Iancu;

— componenta γ, care se manifestă ca o proteinază activabilă prin cisteină, care atacă colagenul modificat, dar nu colagenul brut. Serul antihistolitic, preparat pe cai, conține anticorpi specifici pentru toate aceste trei componente.

După Weinberg și Séguin, toxina *Cl. histolyticum* nu conține un factor hemolitic.

Cl. histolyticum elaborează o colagenază care pare să fie o proteinază specifică cu o putere mare catalizatoare capabilă să determine clivajul hidrolitic al colagenelor denaturate sau nedenaturate. Această colagenază, care purificată este o proteină globulară cu greutate moleculară mare poate fi folosită pentru debridarea enzimatică în arsurile accidentale, permițînd autogrefele.

Infecția experimentală. *Cl. histolyticum* este patogen pentru toate animalele de laborator. Cel mai sensibil este șobolanul.

Cobaiul sau iepurele, cărora li s-a inoculat pe cale intravenoasă 1 ml de cultură, mor în cîteva minute, cu aceleași simptome cu care mor după inoculare cu venin de cobra: dispnee intensă, cu contracții spasmodice ale membrelor și comă.

Animalul inoculat pe cale intramusculară, după ce mai întîi are contracții violente ale capului și gîtului, prezintă la locul inoculării leziuni caracteristice; la cîteva ore apare o roșeață violacee, însoțită de un edem moale și depresibil, cu mare tendință de invadare; ceva mai tîrziu se produce o digestie a țesutului conjunctiv perimuscular, însoțită de disocierea şi lichefierea fasciculelor musculare, care se prezintă ca o adevărată histoliză, ce se întinde de la piele pînă la os. Dacă se incizează tumefacţia se scurg serozităţi hemoragice, care conţin ţesuturi digerate, cu prezenţa a numeroşi germeni mobili. Histoliza nu este putridă şi nu se întovărăşeşte de gaze. Uneori se poate produce o autoamputare inflamatoare.

Imunitatea. Se pot obţine seruri hipermune, pentru a fi încorporate în serul antigangrenos polivalent. În infecţia experimentală se pot obţine rezultate favorabile dacă se foloseşte în anumite condiţii antitoxina *Cl. septicum*, care posedă putere protectoare contra sporilor de *Cl. histolyticum* (Ştefănescu şi colaboratorii) (antitoxina de *Cl. septicum* neutralizează antigenul letal α al toxinei *Cl. histolyticum*).

*

În afară de clostridiile studiate mai sus, în plăgile complicate cu floră anaerobă se mai întîlnesc foarte rar, o altă grupă de clostridii, cu patogenitate mult mai redusă, printre care ar trebui reamintite *Cl. sordelli*, *Cl. bifermentans*, *Cl. sporogenes* etc.

Cum acestea sînt încă insuficient studiate şi nu prezintă o pondere mare în patogenia infecţiilor anerobe, aceşti germeni nu vor mai fi prezentaţi.

Aşa după cum s-a văzut mai sus, împreună cu anumiţi germeni aerobi, unele clostridii patogene cauzează la om un număr de aspecte clinice diferite, pe care Prévot le-a clasat în miozite, viscerite şi septicemii, dar care sînt cunoscute mai ales sub denumirea, cîteodată improprie, de gangrenă gazoasă.

Gangrena gazoasă poate apărea între 6 ore şi 5 zile de la rănire. Factorii favorizanţi ai izbucnirii sînt contaminările plăgilor anfractuoase prin intermediul pămîntului, fecalelor etc., la care se adaugă strivirea ţesuturilor, hematoamele neresorbabile, fracturile cominutive, ligaturile arteriale, şocul hemoragic etc.

Simptomele principale ale gangrenei gazoase declarate sînt : mirosul plăgii, edemul masiv, lemnos sau crepitant.

Mioliza este accentuată, fără respectarea regiunilor anatomice. Febra este variabilă, în raport cu flora microbiană din plagă şi cu capacitatea invadantă a germenilor în circulaţie.

Starea generală este puternic alterată, însoţită deseori de icter şi hemoglobinurie.

Prognosticul este foarte grav. După Nestorescu şi Guleke, cazurile netratate sînt mortale 100%. Folosirea actului chirurgical, care trebuie să primeze în tratamentul complex al afecţiunii, face ca mortalitatea să scadă simţitor; la tratamentul chirurgical, care trebuie să fie aplicat precoce, asocierea seroterapiei pentru dezintoxicarea răniţilor, şi a chimioterapicelor (sulfamide şi antibiotice) au diminuat considerabil mortalitatea.

Alături de gangrena gazoasă, care aproape niciodată nu este monomicrobiană, se grupează o altă serie de afecţiuni clostridiale, care sînt datorite numai unor anumite clostridii patogene.

Printre acestea ar trebui reamintite :

1. Miozitele medicamentoase, datorite *Cl. perfringens* sau *Cl. histolyticum*, care se dezvoltă fulgerător, de cele mai multe ori favorizate de ische-

mia provocată prin injecţie, sînt mai totdeauna mortale. Substanţele incriminate au fost adrenalina, dintre care un caz a fost studiat şi în ţara noastră de către Nestorescu şi colaboratorii, cafeina, sparteina, novocaina, uleiul camforat, sulfatiazolul etc.

2. Enterotoxemia necrozantă a omului, cauzată de *Cl. perfringens* tip F, germen bine studiat de către Schütz şi Oakley, a fost semnalată pentru prima oară în Germania, în 1946; este frecvent mortală (50%). Enterotoxemia necrozantă izbucneşte după consumul de conserve de carne, ficat şi peşte, rău preparate, perioada cea mai favorabilă apariţiei bolii fiind toamna. Simptomele digestive sînt însoţite de tulburări generale toxice. Germenul este prezent mai ales în *muscularis mucosae* a regiunii jejunale.

3. Septicemiile determinate cel mai adesea de *Cl. perfringens*, după avort septic provocat, sînt mai totdeauna mortale. *Cl. septicum* şi mai rar *Cl. oedematiens* pot cauza, de asemenea, septicemii mortale.

Diagnosticul bacteriologic al infecţiilor clostridiale gangrenoase

Identificarea precisă a clostridiilor gangrenoase pentru nevoi imediate clinice se face rar, deoarece rezultatele de laborator vin prea tîrziu, în raport cu cerinţa precocităţii tratamentului. Necesitatea identificării este legată mai ales de variaţia regională a acestor clostridii, cerută de prepararea serurilor antigangrenoase, care servesc la profilaxia sau tratamentul gangrenei gazoase declarate, precum şi la eventuala preparare a componentelor din polianatoxinele clostridiale, care încep să fie folosite în vederea unei imunizări active a oamenilor şi animalelor.

Produsele patologice obişnuite de examinat sînt: exsudate din plagă, fragmente musculare, conţinutul hemoragic al flictenelor, sînge (hemocultură), fragmente de organe şi produse patologice recoltate la autopsie, fecale, pămînt, conserve, catgut, soluţii medicamentoase etc.

1. **Bacterioscopia** se poate practica imediat şi este plină de învăţăminte. La examenul direct, între lamă şi lamelă, sau, şi mai bine, într-un tub capilar, închis la flacără la ambele capete şi fixat cu plastilină pe platina microscopului, se constată floră variată, printre care şi unii germeni cu aspect de clostridii mobile sau imobile, incapsulate sau nu. Alături de această floră se constată foarte rare leucocite, şi acestea deseori distruse, precum şi rare hematii pe cale de hemoliză.

La examenul direct, după coloraţie Gram, se pune în evidenţă flora gramofilă şi negramofilă cu morfologia specifică, cunoscută.

Pentru interpretarea preparatelor se va ţine seama totdeauna de particularităţile florei microbiene, cu caracterele ei morfologice şi de coloraţie, precum şi de elementele celulare care o întovărăşesc.

2. **Izolarea germenilor** se face în condiţiile arătate la tehnica generală pentru studiul anaerobilor (vezi mai departe).

3. **Identificarea speciei microbiene izolate** se face pe baza caracterelor morfologice, de cultură, biochimie şi neutralizare a culturii sau, şi mai bine, a toxinei prin antitoxină.

Pentru această ultimă probă se procedează în felul următor:

Se iau o serie de şoareci, care se împart în loturi de cîte două animale. Fiecare lot primeşte, pe cale subcutanată sau intramusculară, un amestec de 0,2 ml ser specific, aparținînd unei anumite specii anaerobe patogene, cu 0,2 ml din cultura de 24 de ore a tulpinii izolate. Un lot martor primește numai cultură. Animalele sînt urmărite 72 de ore. Șoarecii protejați de către serul omolog supraviețuiesc, animalele care au primit ser heterolog sau au servit ca martor mor de obicei în acest interval de timp.

O dată specia identificată, germenul trebuie să fie etichetat după tipul toxigen căruia îi aparține. Acest lucru este indispensabil, mai ales pentru *Cl. perfringens*.

În acest scop se folosește metoda de identificare Oakley, care este următoarea :

— se trec în cîteva tuburi cîte 2—3 ml din filtratul culturii de examinat ;

— se adaugă în fiecare tub cîte 0,01 ml ser antitoxic de tip A, B, C, D etc. ;

— se lasă 30 de minute sau mai mult la temperatura camerei sau la termostat, pentru neutralizare ;

— se injectează pe cale intravenoasă cîte 0,5 ml din amestec, la șoareci în greutate de 16—19 g. Se pot aștepta următoarele rezultate prezentate în tabelul de mai jos.

Neutralizarea încrucișată a tipurilor de filtrate, cu serotipuri. Testul letal pe șoarece

Tipul de filtrat	Serotipul			
	A	B	C	D
A	—	—	—	—
B	+	—	+	+
C	+	—	—	+
D	+	—	+	—

Legendă: — = supraviețuire
+ = moarte

Epidemiologie

Complicațiile gangrenoase ale plăgilor au constituit cea mai teribilă cauză a morții răniților de război sau a accidentaților. Infecția a fost favorizată de războiul de staționare, cînd oamenii trăiau în mare promiscuitate în tranșee și lipsă totală de confort, ca și de folosirea armelor brizante (mine, brand, grenade) care, pe lîngă producerea de plăgi anfractuoase, cu devitalizarea țesuturilor, favorizau și pătrunderea în plagă a resturilor vestimentare, schije, pămînt etc.

Folosirea seroprofilaxiei și seroterapiei antigangrenoase (ser polivalent compus din ser anti-*perfringens*, anti-*septicum*, anti-*oedematiens*, anti-*histolyticum* și anti-*sporogenes*) a scăzut incidența complicațiilor gazoase încă de la sfîrșitul primului război mondial ; folosirea chimioterapicelor (sulfamide și penicilină), în al doilea război mondial, a contribuit și mai mult la împiedicarea apariției gangrenei gazoase declarate.

Marea răspîndire a clostridiilor gangrenei gazoase, și în special a *Cl. perfringens*, așa cum fusese demonstrată încă din primul război mondial de către Zeissler, face ca orice plagă murdărită de pămînt să fie considerată contaminată de această specie.

Profilaxia se bazează pe administrarea profilactică a serului antigangrenos la orice rănit cu plăgi unice sau multiple, murdărite de pămînt, în cantitatea de 40—100 ml, în raport cu întinderea şi anfractuozitatea plăgii, însoţită de antibioterapie masivă ; în afară de acestea, se face toaleta chirurgicală a plăgii, care trebuie să constea în debridări largi, cu evacuarea corpilor străini, a hematoamelor etc. şi, eventual, practicarea amputaţiilor de necesitate.

Clostridium botulinum şi toxiinfecţia botulinică

Istoric. Botulismul sau „Wurstvergiftung" al autorilor germani este cunoscut din secolul al XVII-lea. Justinus Kerner, poet şi medic german, comunică în anul 1820 aproximativ 150 de cazuri de intoxicaţie prin cîrnaţi, dintre care 80 mortale. În 1883 în Rusia, Autellrieth descrie această boală ca urmare a consumului de peşte afumat.

În 1895, Van Ermengem, în izbucnirea de botulism care a apărut în Ellezelles (Belgia) a descoperit agentul cauzal. Din şunca consumată, ca şi din intestinul şi splina uneia din victime, Van Ermengem izolează *Cl. botulinum*, căruia îi descrie caracterele morfologice, îl cultivă şi reproduce boala la maimuţă, cobai, iepure, pisică şi porumbel.

În 1910, Leucke pune în evidenţă caracterele speciilor A şi B, iar în 1922 Bengston şi Seddon, pun în evidenţă specia C. În 1927 şi 1928, respectiv, Theiler izolează speciile D şi E, iar în 1958, Moller şi Scheibel adaugă a 6-a specie, tipul F.

Speciile de *Cl. botulinum* sînt puternic toxice : toxina *Cl. botulinum* A este cea mai puternică otravă cunoscută pînă azi, fără ca activitatea toxinelor celorlalte specii să fie mică.

Habitat. *Cl. botulinum* este foarte răspîndit în natură. Sînt întîlniţi în sol, în special în cel cultivat, pe vegetale şi în intestinul omului şi animalelor.

Caractere morfologice. *Cl. botulinum* se prezintă sub formă de bacili cu o lungime de 4—9 μ şi o grosime de 0,9—2 μ. În culturi tinere, germenii se prezintă izolaţi, în perechi, rareori în lanţuri. În culturi vechi sînt polimorfi. Prezintă spori ovalari, subterminali, mai ales în cuturile incubate la 20—30°. Ciliat (4—8 cili, rar mai mulţi). Este gram-pozitiv, se decolorează uşor în alcool şi nu ia coloraţia Gram în culturile vechi.

Caractere de cultură. Bulionul simplu este un mediu puţin favorabil, deşi sporulează şi elaborează toxină ; în bulionul glucozat se obţine o creştere abundentă, cu degajare masivă de gaz şi miros rînced.

Bulionul Tarozzi, ca şi bulionul căruia i s-a adăugat piure de cartofi, fasole sau mazăre, furnizează culturi abundente şi toxină activă. Mediul cu carne tocată şi prăjită oferă o creştere abundentă cu înnegrirea mediului şi mare dezvoltare de gaz.

Geloza în coloană este fragmentată de *Cl. botulinum* din cauza gazelor, dezvoltînd colonii translucide, care privite cu lupa, apar ciuruite din cauza bulelor foarte fine de gaz. Coloniile se înfăţişează cu o margine mai opacă, aspect care distinge colonia de *Cl. botulinum* de ceilalţi germeni anaerobi.

Pe geloză-sînge cu glucoză (sînge de cal 5% şi glucoză 5%) coloniile apar mari, amiboide, semitransparente, umede. Pe acest mediu s-au putut diferenţia, după aspectul morfologic, transparenţă şi hemoliză, 5 feluri de colonii.

Caractere biochimice şi de metabolism. *Cl. botulinum* este strict anaerob, însă creşte aerob în prezenţa germenilor aerobi (*B. subtilis*) sau în bulion cu substanţe reductoare. Temperatura optimă de creştere este 25°; la 37–40° *Cl. botulinum* nu dezvoltă spori, formele de involuţie fiind extrem de numeroase.

Cl. botulinum A este puternic proteolitic şi slab hemolitic, pe cînd *Cl. botulinum* B este mai rar şi mai slab proteolitic. *Cl. botulinum* C şi D nu sînt proteolitici; produc H_2S; nu produc indol. Reacţiile cu roşu de metil şi Voges-Proskauer sînt negative. Reduce albastrul de metilen. În tabelul LXXII sînt prezentate fermentaţiile uzuale ale zaharurilor.

Tabelul LXXII

Tipul de *Cl. botulinum*	Glucoză	Maltoză	Salicină	Glicerol	Galactoză	Inozită	Lactoză
A	+	+	+	+	−	−	−
B	+	+	−	+	−	−	−
C	+	+	−	−	+	+	−
D	+	+	+	+	+	+	+
E	+	+	−	−	−	+	−
F	?	?	?	?	?	?	?

Speciile aparţinînd *Cl. botulinum* elaborează o hemolizină activă pentru hematiile de om, însă nu pentru hematiile de oaie. Hemolizina elaborată de *Cl. botulinum* este mai activă decît cea elaborată de specia *A*.

Hemolizinele botulinice sînt termostabile şi sensibile la lumină şi agitare mecanică.

Rezistenţa la agenţi fizici, chimici şi biologici. Datorită rezistenţei la căldură a sporilor de *Cl. botulinum*, care este cea mai ridicată faţă de sporii oricărui alt germen anaerob patogen. *Cl. botulinum* se comportă deosebit faţă de acest agent. Pe de altă parte, cum rezistenţa la agenţii fizici şi chimici a sporilor domină întreaga problemă a toxiinfecţiei botulinice, studiul acesteia a făcut obiectul a numeroase cercetări. Printre cercetările făcute se menţionează:

— rezistenţa sporilor de *Cl. botulinum* variază cu specia, cu tulpina şi chiar cu culturile diferite ale aceleiaşi tulpini;

— majoritatea sporilor dispar rapid sub influenţa încălzirii, însă 5% dintre aceştia sînt foarte rezistenţi; în mediul umed rezistă 6 ore la 100°, 2 ore la 105° şi 10 minute la 120°;

— sporii sînt mai rezistenţi într-un mediu lichid acoperit cu o pătură de ulei; sporii tineri sînt mai rezistenţi decît cei bătrîni.

Sporii de *Cl. botulinum* sînt mai puţin rezistenţi în soluţiile NaCl 8 – 20% şi la această concentraţie de sare, forma vegetativă şi elaborarea de toxină lipsesc.

Zeama de lămîie 5% nu împiedică formarea sporilor, însă sporii încălziţi într-un mediu acid sînt mai puţin rezistenţi. Termorezistenţa sporilor creşte cu proporţia de zahăr; în soluţie de zahăr 50%, termorezistenţa rămîne urcată mai multe ore.

Structura antigenică. Schoenholz şi Mayer, folosind metoda de aglutinare, au constatat că *Cl. botulinum A* poate fi grupat în 3 tipuri serologice, iar *Cl. botulinum* B, în 4 tipuri. După Dolman, tipul E poate fi grupat în 3 tipuri serologice. Pare să nu existe coaglutinine între tipurile serologice de *Cl. botulinum*. Starin şi Dack, folosind metoda de fixare a complementului, au identificat aceleaşi tipuri serologice.

Caractere de patogenitate. Virulenţa acestui germen este îndoielnică. Majoritatea autorilor îl consideră saprofit şi incapabil de a se înmulţi în organism. *Cl. botulinum* reprezintă un tip particular de germen toxic şi nevirulent, el avînd o foarte slabă putere de invazie. Inocularea de spori spălaţi în cantitate mare poate totuşi provoca apariţia botulismului. Acest fapt experimental are corespondentul său clinic, desigur cu totul rar, al aşa-numitului botulism parenteral.

Toxigeneza este caracterul esenţial de patogenitate a *Cl. botulinum*. Toxina *Cl. botulinum* este cea mai puternică otravă cunoscută pînă astăzi. Ea este de 15 000 de ori mai toxică decît aconitina, cel mai toxic alcaloid cunoscut. Activitatea toxinelor variază cu specia de *Cl. botulinum* şi chiar cu tulpina de germen utilizată. Toxina purificată conţine 1 200 000 D. L. M. pe miligram pentru 1 kg cobai.

Elaborarea de toxină botulinică a fost semnalată mai des în conservele de fasole, porumb, mazăre, gulie, peşte, crevete şi mai rar în conservele de sparanghel, sfeclă, dovleac, spanac. Obţinerea de toxină pentru nevoi de studiu sau producţie se face uşor pe medii cu bază de legume sau cazeină digerată.

Toxina botulinică poate fi purificată prin procedee asemănătoare separaţiei enzimelor. Lamanna, Mc Elroy şi Eklund au reuşit să cristalizeze toxina botulinică. Toxina cristalizată se înfăţişează ca o pulbere albă, electroforetic omogenă, de natură proteică. Ea se comportă ca o globulină cu punct izoelectric la pH 5,6. Numărul aminoacizilor prezenţi în toxina botulinică este de 19, dintre care asparagina, acidul glutamic şi tirozina sînt cantitativ cei mai bine reprezentaţi.

Greutatea ei moleculară este de 900 000. Toxina cristalizată de *Cl. botulinum* A conţine 220×10^6 D. L. M. şoarece pe miligram de azot. După Buchler, formula chimică elementară a toxinei cristalizate de *Cl. botulinum* ar fi $C_{40298}\ H_{62679}\ N_{10472}\ O_{12634}\ P_{15-17}\ S_{123}$.

Toxina botulinică a putut fi extrasă din corpi microbieni (Raynaud) şi chiar din spori (Keppie).

Temperatura optimă de producere a toxinei este considerată 35°, însă ea poate fi elaborată atît la 22°, cît şi la 37°. Toxina de *Cl. botulinum* este potenţată la un pH acid. Pepsina şi tripsina sînt fără acţiune asupra toxinei. Lichidele de cultură a *Cl. botulinum* A, B şi E conţin un inhibitor al tripsinei, termostabil (rezistă 2 ore la 100°). Este insolubilă în eter şi cloroform, însă alcoolul îi scade activitatea. Formolul o transformă în toxoid. Este distrusă de concentraţii convenabile de permanganat, iod şi clor şi mai ales de clorul liber, în 15 minute.

Mai rezistentă la căldură decît alte exotoxine, toxina botulinică poate rezista la 80° între 5 și 60 de minute.

Puterea patogenă a toxinelor botulinice este variabilă cu specia, cu tulpina de *Cl. botulinum* căreia ne adresăm, precum și cu animalul folosit pentru experiență și calea de administrare. Toxina tipului F se apropie de toxinele tipurilor A și B, însă ea este de o putere toxică per os foarte scăzută, prezintă instabilitate, iar *Cl. botulinum* tip F are o tendință marcată la mutante cu pierderea puterii toxigene (Dolman 1961).

Peștii și broaștele sînt refractare; cîinele și pisica sînt specii de animale destul de rezistente; în schimb maimuța, iepurele, cobaiul, șoarecele, capra și calul sînt sensibile.

Pentru studiul botulismului experimental, animalul de preferat este cobaiul. Inocularea pe cale subcutanată a unei cantități de 0,00005 — — 0,0001 ml cultură omoară sigur animalul. Trebuie cantități de 1 000 de ori mai mari pentru a omorî animalul pe cale orală decît pe cale peritoneală.

Șoarecele, deși mai rezistent decît cobaiul, moare în urma inoculării unei cantități infinitezimale de toxină. Acest animal pare mai sensibil la ingestia de toxină decît la administrare pe cale parenterală.

Acțiunea farmacodinamică a toxinelor botulinice este bine studiată. Cu toate că toxinele speciilor de *Cl. botulinum* (A, B, C, D, E) sînt imunologic diferite, se pare că ele toate lucrează prin același mecanism. O dovadă în acest sens o constituie simptomatologia asemănătoare a botulismului uman și animal, ca și a botulismului experimental, oricare ar fi specia cauzală de *Cl. botulinum.*

Mecanismul de acțiune a toxinelor botulinice este încă insuficient cunoscut. Încă din 1923, Schubel a observat că toxina botulinică lucrează în felul curarei, iar Torda și Wolf au demonstrat că toxinele botulinice posedă o acțiune antienzimatică în ciclul acetilcolinei la nivelul plăcilor mio-neurale. După Merker, toate semnele neurovegetative ale botulismului pot fi explicate prin acțiunea toxinei botulinice asupra ciclului acetilcolinei, acțiunea inhibitoare a colinesterazei provocînd o acțiune curarizantă asupra musculaturii netede. De curînd Stefenson și Girvin, plecînd de la faptul că acetilarea colinei la nivelul celulelor mamiferelor ține de un mecanism identic cu cel folosit de specia *Lactobacillus plantarum* sinteza microbiană a acetil-colinei, au studiat efectul toxinei botulinice asupra acetilării bacteriene a colinei.

Acești autori au arătat că toxina botulinică nu inhibează sinteza și secreția acetilcolinei, fie că germenii se găsesc în proliferare activă sau în faza de repaus. Mai mult, toxina botulinică nu exercită efecte nici asupra acetilcolinei elaborate de germeni și nici asupra componentelor sistemului acetilant (coenzima A și adenozinitrifosfatul).

Intoxicația botulinică exercită o acțiune puternică asupra sistemului nervos vegetativ și totuși leziunile histologice sînt în general minime.

Printre primii cercetători care s-au ocupat cu histopatologia botulismului a fost Marinescu, care a pus în evidență leziuni în nucleii nervilor cranieni. Alți autori au observat deformări ale corpusculilor Nissl, neuronofagie, tromboza capilarelor creierului etc. Cercetătorul sovietic Minervine a constatat că doze minime de toxină botulinică inhibează fagocitoza.

Pătrunderea toxinei botulinice în organism pare să se facă prin limfocitele intestinului, trecerea toxinei în sînge făcîndu-se prin canalul toracic. Cînd este în cantitate apreciabilă, toxina poate fi pusă în evidenţă în sîngele circulant. Fixarea toxinei în organism este posibilă, fără a-şi pierde activitatea specifică, eliminarea ei făcîndu-se prin urină şi fecale.

Boala la om. După o perioadă de incubaţie variabilă de la 2 ore la 8 zile, după ingerarea unui aliment conservat, în care s-a dezvoltat *Cl. botulinum*, apar o serie de simptome caracteristice toxiinfecţiei alimentare.

Primul simptom este o oboseală accentuată, însoţită de ameţeli, cefalee şi constipaţie. Oboseala este însoţită de asemenea de insomnie. dispnee şi anxietate.

Se constată şi o diminuare a forţei musculare, în special a membrelor superioare şi a muşchilor cefii. În raport cu gravitatea intoxicaţiei se pot observa : ptoză palpebrală, mişcări limitate ale globilor oculari, diplopie însoţită de midriază, dificultate în deglutiţie şi vorbire. Cunoştinţa bolnavilor este clară. Complicaţiile, în special bronhopneumonia sau pneumonia prin aspiraţie, ca urmare a parezei bronhiale, sînt însoţite de febră.

Moartea este datorită totdeauna paraliziei muşchilor respiratori, bătăile inimii putînd fi auzite încă un timp şi după ce respiraţia a încetat.

După Rambert, ordinea în care apar tulburările în botulism este următoarea : tulburări ale stării generale, tulburări de vedere (midriază, paralizie de acomodare, pierderea reflexelor fotomotoare, diplopie, strabism mergînd pînă la oftalmoplegie completă), disfagie, disfonie, paralizia membrelor şi, în fine, tulburări cardiace şi respiratorii care anunţă moartea.

Durata bolii în cazurile letale este în medie de 2 – 6 zile.

Botulismul la om poate apărea şi prin introducerea *Cl. botulinum* în plăgi.

Botulismul la animale. Caii şi catîrii fac o toxiinfecţie botulinică prin consum de furaj contaminat (ovăz) ; la fel vitele mari şi oile. La acestea din urmă, boala este cunoscută sub numele de „Lamziekte" şi se caracterizează prin pareze musculare şi paralizii ale muşchilor masticatori şi ai deglutiţiei.

Puii de găină şi raţele fac o boală asemănătoare botulismului, denumită în cazul puilor de găină „Limberneck", iar în acela al raţelor „boala raţelor". Boala este caracterizată prin lipsa de coordonare musculară, slăbiciune, căderea capului, anorexie, prostraţie şi comă.

Tratamentul specific al botulismului uman se efectuează prin administrare precoce a serului polivalent antibotulinic mai întîi şi apoi, după cunoaşterea speciei cauzale de *Cl. botulinum*, a serului monovalent respectiv.

Administrarea intramusculară sau mai bine pe cale intravenoasă a unei cantităţi de 50 ml de ser antibotulinic, timp de cîteva zile, oferă maximum de eficienţă. După Welikanov şi Kolesnikova, seroterapia este singurul tratament eficace.

Asocierea seroterapiei cu administrarea de acetilcolină a dat foarte bune rezultate (Nestorescu, cazuri personale). Transfuziile de sînge, administrarea de vitamină B_1 în mari cantităţi şi a alcoolului care precipită toxina încă neabsorbită au fost larg utilizate.

Utilizarea plămînului artificial cu presiune pozitivă, timp necesar, s-a dovedit de o mare eficacitate.

Imunitatea obţinută prin trecerea prin boală este puţin cunoscută. Se poate obţine o imunitate specifică, puternică şi durabilă, sub acţiunea anatoxinei botulinice.

Diagnosticul de laborator

Prin diagnosticul de laborator se urmăreşte izolarea şi identificarea agentului cauzal, precum şi punerea în evidenţă a toxinei botulinice în alimentul incriminat şi produsele patologice recoltate de la bolnavi.

Produsele de examinat sînt: alimentul conservat incriminat, produse patologice (vărsături, fecale, sînge, urină) şi eventual organe prelevate la autopsie.

A. **Recoltarea produselor.** Alimentul incriminat prin ancheta epidemiologică se ambalează şi se transportă la laborator rapid şi în bune condiţii. Se utilizează ca material de examinat, atît resturile solide, cît şi cele lichide (zeama rămasă în cutia de conserve). După ridicarea materialului de cercetat, cutia de conserve sau recipientul care a conţinut conservele se incinerează sau se îngroapă adînc în pămînt. Fragmente din resturile de alimente (circa 20 g) sînt fin tăiate cu o foarfecă sau un bisturiu şi ulterior trecute într-un mojar unde se adaugă în volume egale, soluţie de clorură de sodiu $8{,}5\,^0/_{00}$. Aceasta se adaugă numai în cazul cînd nu se mai găseşte zeamă în interiorul recipientului. Amestecul este triturat în mojar cu nisip steril.

În timpul triturării, care trebuie făcută cu atenţie deosebită, pentru a se evita sărirea pe conjunctive a stropilor din produs, experimentatorul trebuie să poarte ochelari de protecţie. Produsul de triturare se centrifughează apoi la 3 000 de turaţii/min. Supernatantul constituie materialul de inoculat la animale (cobai, şoareci), iar sedimentul serveşte pentru însămînţări.

Produsele obţinute prin vărsături sînt tratate în acelaşi mod ca şi alimentul conservat.

Fecalele se obţin prin enteroclisme bogate, bolnavii fiind constipaţi din cauza parezei intestinale care se instalează o dată cu boala.

Materiile fecale lichide se centrifughează 20 de minute la 3 000 turaţii/min. Supernatantul se inoculează la animalele sensibile, iar sedimentul serveşte pentru izolarea *Cl. botulinum*.

Sîngele necesar pentru cercetarea toxinei botulinice circulante, sau pentru punerea în evidenţă a puterii protectoare a serului bolnavilor trataţi cu ser antibotulinic omolog, trebuie recoltat în condiţii de sterilitate. Cantitatea de sînge necesar pentru cercetarea toxinei botulinice circulante este de aproximativ 40 ml.

Urina necesară pentru punerea în evidenţă a toxinei botulinice se recoltează prin sondă vezicală. Ea se examinează repede după recoltare.

Organul folosit pentru punerea în evidenţă a toxinei botulinice este ficatul. Se ridică la necropsie fragmente de ficat, care sînt examinate în aceleaşi condiţii ca şi probele de aliment. Supernatantul obţinut după centrifugare (3 000 de turaţii/min) se inoculează la animale. Sedimentul este folosit pentru însămînțare, *Cl. botulinum* fiind izolat uneori din acest organ.

B. **Insămînțarea și izolarea germenului.** Sedimentul obținut prin centrifugarea suspensiilor de aliment, produselor de vărsătură, fecalelor și organelor (ficat) sînt însămînțate pe medii de cultură în felul următor:

1. Suspensiile în ser fiziologic, efectuate cu diferitele sedimente, sînt încălzite timp de 30 de minute la 80°, pentru a distruge germenii nesporulați, precum și formele vegetative ale germenilor sporulați. După răcirea suspensiilor se însămînțează.

2. Deoarece *Cl. botulinum* este greu de cultivat și obținut mai ales în cultură pură, se recomandă să se folosească mai întîi un mediu de îmbogățire. Redăm mai jos formula de preparare a unui mediu de îmbogățire, indicat de Weinberg, care a dat bune rezultate:

— Se prepară o infuzie de inimă de bou; aceasta este curățată de grăsime și triturată fin în 1 000 ml apă. Produsul de triturare este încălzit lent pînă la fierbere. Se aduce la pH 8; se răcește și se ridică spuma.

— Se pun la digerat: stomac de porc, fin tăiat, 400 g și ficat de bou 100 g, în 4 litri de apă de robinet conținînd 40 g acid clorhidric. Se încălzește la 50°. Se menține amestecul 18 — 24 de ore la 50°. Se controlează produsul prin reacția biuretului și pentru prezența triptofanului. Dacă amîndouă reacțiile sînt pozitive, se încălzește amestecul 10 minute la 100°, pentru a opri digestia. Se lasă să se răcească și se decantează după 24 ore. Se încălzește din nou lichidul la 70°, se neutralizează cu carbonat de sodiu, se filtrează și se adaugă $2^{0}/_{00}$ fosfat bibazic de potasiu; se aduce la pH 7,4.

— Se amestecă infuzia de inimă de bou cu produsul de digestie peptică în proporție de 1/2. Se adaugă $2{,}5^{0}/_{00}$ glucoză, se aduce la pH 7,4 cu bicarbonat de sodiu și se sterilizează la 100°, timp de o oră.

3. Culturile pozitive, obținute pe mediul de îmbogățire Weinberg sînt trecute pe plăci cu geloză-sînge.

4. Plăcile cu geloză-sînge se prepară în felul următor:

— bulionul cu infuzie de inimă de bou și produsul de digestie a ficatului de bou este glucozat $5^{0}/_{00}$ și adiționat cu geloză $15^{0}/_{00}$. Se aduce la pH 7 — 7,2. Se sterilizează 20 de minute la 100° (5 zile consecutiv). Se controlează sterilitatea 2 zile. Se adaugă după topire și răcire 7 — 10% sînge de oaie defibrinat și conservat 15 zile la gheață.

5. Mediul de îmbogățire și plăcile cu geloză-sînge sînt incubate în aparatul Mc Intosh sau Zeissler, controlîndu-se zilnic, timp de 7 — 8 zile, cu ochiul liber sau lupa. Coloniile sînt mari, amiboide, umede, cenușii, semitransparente și cu o zonă de hemoliză în jurul lor.

C. **Identificarea *Cl. botulinum* și a speciei în cauză.** După ce se controlează caracterele morfologice, de cultură și biochimice, germenii izolați sînt însămînțați pentru obținerea toxinei. Un mediu eficient pentru obținerea toxinei este bulionul „Vf", al cărui mod de preparare este redat la „Tehnici pentru studiul germenilor anaerobi".

După 3 — 5 zile de incubare, cultura se centrifughează și se filtrează. Filtratul obținut — foarte toxic — este inoculat la animale sensibile de laborator (cobai, șoareci), care mor cu simptomele caracteristice botulismului experimental.

Pentru identificarea *Cl. botulinum* se procedează în felul următor: toxina o dată obținută este titrată în vederea stabilirii dozei certe letale

(D.C.L.) pentru şoarece sau cobai, toxina administrîndu-se subcutanat sau intraperitoneal.

În tabelul LXXIII se prezintă un protocol de determinare a D.C.L. a toxinei botulinice.

Tabelul LXXIII

Şoareci inoculaţi	Diluţia toxinei	Cantitatea injectată subcutanat	Şoareci	
			Vii	Morţi
2	1 : 15 000	0,5 ml	0	2
2	1 : 150 000	,,	0	2
2	1 : 500 000	,,	0	2
2	1 : 1 000 000	,,	0	2
2	1 : 5 000 000	,,	1	1
2	1 : 10 000 000	,,	2	0

0,5 din 1/1 000 000 = D.C.L. = 1/2 000 000

Diluţia de toxină se prepară cu soluţie 8,5 $^{0}/_{00}$ de clorură de sodiu, avînd grijă să schimbăm pipeta după fiecare diluţie.

Pentru identificarea subspeciei de *Cl. botulinum*, căreia îi aparţine toxina, se fac amestecuri de toxină cu antitoxina speciilor A, B şi E. Amestecurile sînt inoculate la şoareci (eventual cobai). Ca martori se folosesc animale care au primit numai toxina (în cantitate mai mică).

Un protocol de experienţă este expus în tabelul LXXIV.

Tabelul LXXIV

Animale inoculate (şoareci sau cobai)	Toxina de cercetat	Ser antibotulinic			Rezultat
		A	B	E	
2	100 D.C.L.	1 U.A.	—	—	++
2	,, ,,	—	1 U.A.	—	0
2	,, ,,	—	—	1. U.A.	++
2	10 D.C.L.	—	—	—	++

Amestecurile sub volum de 1 ml (0,5 ml toxină + 0,5 ml ser antitoxic) sînt lăsate 30 de minute la 37° şi apoi sînt inoculate subcutanat la şoarece sau cobai. În cazul protocolului de mai sus, toxina aparţine *Cl. botulinum*, tip B.

D. Punerea în evidenţă a toxinei botulinice şi identificarea speciei căreia îi aparţine. Lichidul supernatant, obţinut după centrifugarea alimentului triturat, produselor de vărsătură, fecalelor, eventual, a organului (ficat), serul sanguin, inactivat 30 de minute la 56° (alexina de om inoculată intraperitoneal la cobai este toxică) şi urina servesc ca material căruia i se determină toxicitatea specifică.

Pentru că acest material este de obicei contaminat şi cu alte specii microbiene care pot fi patogene pentru animalele de experienţă, în vederea împiedicării poluării germenilor se adaugă o cantitate dintr-un anumit antibiotic; de pildă, Geurden adaugă penicilină.

Dacă ne servim de şoareci ca animale de laborator, toxina se pune în evidenţă inoculînd 0,5 şi 1 ml din produsul de examinat pe cale intraperitonează la un număr de animale. În eventualitatea prezenței toxinei în aceste produse, animalele mor într-un timp scurt (cîteva ore). La cobai, materialul de examinat se inoculează subcutanat, în cantitate de 1 — 2 ml.

Pentru identificarea speciei de *Cl. botulinum* se procedează după protocolul din tabelul LXXV.

Tabelul LXXV

Nr. șoarecilor	Protecția șoarecilor efectuată cu :	Supernatant inoculat pe cale peritoneală	Șoareci	
			Morți	Supraviețuitori
2	0,5 ml ser antibotulinic A sau 300 U.I.A.	0,5 ml	2	0
2	0,5 ml ser antibotulinic B sau 300 U.I.A.	0,5 ml	0	2
2	0,5 ml ser antibotulinic E sau 300 U.I.A.	0,5 ml	2	0
2	—	0,5 ml	2	0

N.B. Protecția șoarecilor se face inoculînd cantitatea de ser antibotulinic pe cale subcutanată, cu cîteva ore înainte

După cum reiese din tabelul LXXV : toxina aparține *Cl. botulinum*, tip B.

Epidemiologie

Botulismul este datorit consumului de alimente contaminate de o specie de *Cl. botulinum*, în care germenul a putut să se înmulțească și să elaboreze toxina specifică. Din această cauză, boala apare în izbucniri sporadice, limitate numai la consumatorii care s-au hrănit cu alimentul contaminat. Cum din punct de vedere patogenic, boala se manifestă mai curînd ca o intoxicație pură decît ca o infecție, izbucnirea nu se întovărășește de apariția de cazuri secundare. Boala se poate ivi însă la o serie de animale peridomestice, care sînt hrănite cu resturile de alimente incriminate.

Morbiditate și mortalitate. Botulismul uman este o boală relativ rară. După Meyer, izbucnirile de botulism apărute în S.U.A. și în Canada, între 1899 și 1947, au fost în număr de 462 ; cele mai multe au fost semnalate în California (Dack). În S. U. A., din 1918 pînă în 1925 au fost semnalate aproximativ 13 izbucniri pe an.

În Germania au fost 24 de izbucniri între 1907 și 1923.

În Franța recrudescența botulismului s-a observat în timpul ocupației germane din 1940 — 1944. În această perioadă au fost înregistrate aproximativ 1 000 de cazuri de botulism uman.

În țara noastră sînt publicate, în ultimii 30 de ani, numai 7 izbucniri, care au totalizat un număr de 17 cazuri (Nestorescu și Popovici, 1951).

Izbucnirile de botulism au variat ca incidență în raport cu consumul de conserve din diferite țări. Meyer a întocmit un tabel în care a arătat distribuția geografică a botulismului, începînd cu secolul al XVIII-lea (tabelul LXXVI).

Morbiditatea este variabilă cu numărul persoanelor care au consumat alimentul incriminat. În unele izbucniri s-au îmbolnăvit 30 — 50% din consumatori, în altele mai mult. Sînt puține izbucnirile în care s-au îmbolnăvit 100% din consumatori. Variabilitatea morbidității este dependentă de caracterul insular al cuiburilor microbiene din conservele infectate, de fluiditatea conținutului cutiei sau flaconului care conține conservele și care îngăduie difuziunea și omogenizarea toxinei în conținutul lor, precum și de cantitatea de aliment ingerată.

Tabelul LXXVI

Intervalul	Localități, regiuni, țări, continente	Numărul cazurilor de boală	Decese
1735—1874	Würtemberg	920	366
1789—1908	Europa	1 961	688
1866—1923	Germania	838	134
1897—1924	Prusia	397	65
1895—1906	Belgia	38	3
1901—1915	Danemarca	4	1
1875—1924	Franța	21	3
1860—1926	Marea Britanie	75	10

După datele din literatură, mortalitatea în botulism este legată de tipul de toxină botulinică introdusă în organism, de cantitatea absorbită, precum și de rapiditatea apariției simptomelor.

După Dack, letalitatea în botulism a atins în S. U. A. o proporție de 65%; în Europa, letalitatea este ceva mai scăzută: în Rusia și ulterior în U. R. S. S., letalitatea a variat între 50 și 60%; (Gromașevski și Vaindrah); în Germania, între aceleași limite. În Franța, greu de explicat de altfel, botulismul de ocupație a determinat o letalitate foarte joasă (1,5%). În țara noastră, mortalitatea prin botulism a fost de 13,5% (Nestorescu și Popovici, 1951).

Diferențele constatate privitor la letalitate sînt, fără îndoială, legate și de tipul de toxină botulinică ingerată. Se știe că mortalitatea este mai ridicată în intoxicațiile datorite speciei A, decît celei B, prima specie elaborînd o toxină care, după unii autori, este de 1 000 de ori mai activă decît cea de a doua.

Referitor la corelația dintre rapiditatea apariției simptomelor și letalitate, cercetările lui Burke sînt instructive: dacă simptomele de botulism se dezvoltă în primele 24 de ore de la ingerarea alimentului incriminat, mortalitatea este de 84%; ea este de 55% în cazul incubației de 72 de ore și numai de 20% în aceea de 8 zile.

Alți factori epidemiologici. Botulismul uman este mai des întîlnit în sezonul de iarnă, sezon de creștere a consumului de alimente conservate. Într-adevăr, îmbolnăvirile de botulism, în America, sînt mai frecvente în intervalul octombrie-februarie, decît în restul anului.

Diferențieri de sex și vîrstă nu sînt semnalate, deși în America îmbolnăvirile au fost mai frecvente la femei. Aceasta s-ar putea datori, după Gromașevski, faptului că femeile gustă adesea alimentele crude înainte de a le prepara.

Nu se cunoaşte că botulismul să fi apărut vreodată în urma consumului de alimente proaspete, fierte sau nefierte; mai toate izbucnirile comunicate au fost determinate de alimente afumate, uscate sau rău conservate, ingerate fără a fi fierte sau fierte insuficient (Jordan).

Importanţa condiţiilor de preparare a conservelor este de netăgăduit pentru apariţia botulismului. Conservele de casă, care sînt mai des incriminate, sînt datorite condiţiilor neigienice de preparare. Dacă se cercetează originea conservelor care au cauzat botulismul în S. U. A. din 1899 şi pînă în 1947, se constată că din 462 de izbucniri semnalate, 367 au fost determinate de conservele preparate în casă şi numai 48 au fost datorite conservelor preparate de fabrici.

Alimente incriminate. Alimentele care au cauzat botulismul au variat cu preferinţele diferitelor ţări pentru anumite alimente conservate, impuse, cel mai adesea, de obiceiurile culinare locale şi de disponibilităţile produselor supuse conservării.

Fructele şi vegetalele conservate au fost cel mai des semnalate drept cauză a intoxicaţiei botulinice. Astfel, în America, Armstrong şi Edmondson au incriminat măslinele, Geiger şi Stricker, fasolea verde, mazărea şi spanacul. Alţi autori au descris intoxicaţii botulinice datorite sfeclei, sparanghelului, roşiilor, castraveţilor. Autorii sovietici au descris izbucnirea de botulism de la Dniepropetrovsk (1933), ca fiind datorită dovleceilor. Ardeii, piersicile, unele murături au fost de asemenea semnalate de alţi autori.

În al doilea rînd, au fost incriminate carnea şi produsele de carne conservată. Printre acestea, cîrnaţii, şunca, carnea de vită mare, carnea sărată de porc, puii de găină, pateurile etc. au dat un număr destul de mare de intoxicaţii.

Peştele conservat (afumat, uscat, sărat, marinată) a determinat de asemenea numeroase izbucniri. Morunul (batogul), somnul, sardelele, crabii, hamsiile, heringii, ţîrii au fost rînd pe rînd cauzatori ai botulismului uman.

În America, fructele şi vegetalele au dat numărul cel mai mare de îmbolnăviri. În Europa centrală, botulismul a fost cauzat de consumul conservelor de carne, în special cîrnaţi, pe cînd în Rusia, peştele a fost foarte frecvent incriminat.

Factorii care influenţează dezvoltarea în alimente a Cl. botulinum. Distribuirea aşa de largă a *Cl. botulinum* în natură face ca fructele, vegetalele, carnea rău preparată, peştele, etc., să fie des contaminate, prin *Cl. botulinum.*

Se pare că insectele nu sînt străine de transportul pe alimente al germenilor din grupul *Cl. botulinum.*

De fapt, întreaga epidemiologie a botulismului este legată de biologia particulară a sporilor botulinici. Faptul că germenii sînt totuşi aşa de răspîndiţi, iar botulismul nu este o boală prea des întîlnită, arată că sînt necesari factori deosebiţi care să determine germinarea, înmulţirea şi elaborarea de toxină. Printre aceştia se pot enumera : pH, numărul de spori, tinereţea lor, alimentul în care germinează şi se înmulţesc, condiţiile de elaborare a toxinei etc.

Factorii esențiali rămîn totuși : prezența sporilor în număr convenabil, insuficienta încălzire a alimentelor, condițiile anaerobe, fierberea înceată, folosirea alimentului fără fierbere finală etc.

Profilaxie specifică. Oamenilor de laborator însărcinați cu prepararea anatoxinelor și serurilor specifice antibotulinice sau anumitor categorii de muncitori li se poate administra în scop profilatic un amestec de anatoxină botulinică de tip A și B, adsorbite pe suport mineral. Vaccinarea constă în inocularea de 1 ml anatoxină în amestec, repetată de trei ori, la interval de 2 luni (Reames).

Trebuie reamintit că oricare ar fi tehnica utilizată în scopul aplicării anatoxinelor la om, apariția anticorpilor este foarte lentă.

Tehnici pentru studiul germenilor anaerobi

Oxigenul atmosferic fiind dăunător pentru germenii anaerobi, întreaga tehnică bacteriologică utilizată pentru studierea acestor germeni suferă modificări în raport cu tehnica bacteriologică folosită pentru germenii aerobi.

Întreaga aparatură, manoperă și alte condiții tehnice sînt menite să asigure :

I. Înlăturarea O_2 liber, din mediile de cultură, cu scopul obținerii anaerobiozei ;

II. protecția anaerobiozei pe toată durata cercetării.

Inlăturarea O_2 liber

Aceasta se obține prin 3 categorii de metode : fizice, chimice și biologice.

1. **Metode fizice.** *a*) Regenerarea prin fierberea mediilor lichide (bulion) : bulionul repartizat în tuburi se fierbe 15 minute. La terminarea fierberii, tuburile se introduc imediat în apă rece, pentru a se răci brusc. În timpul fierberii, oxigenul din mediu este îndepărtat. Dacă se regenerează bulionul repartizat în balonașe, fierberea durează 30 de minute ; la terminare, se adaugă bulion fierbinte din alt balonaș cu bulion, regenerat în același timp, astfel ca nivelul mediului să se ridice pînă la mijlocul gîtului balonului. Balonașele astfel umplute se răcesc brusc în apă rece.

b) Obținerea vidului cu ajutorul pompei de vid : un tub cu mediu de cultură, confecționat de preferință din sticlă ușor fuzibilă, se regenerează în condițiile arătate mai sus și după însămînțare, se efilează cu ajutorul flăcării în treimea sa superioară. La extremitatea superioară a tubului astfel efilat se introduce un dop de cauciuc, perforat, prin care trece un tub de pipetă, al cărui capăt exterior se atașează la o pompă de vid cu ajutorul unui tub de cauciuc. Se extrage aerul din tub, avînd grijă ca mediul de cultură să nu ajungă la dop în timpul efectuării vidului, ajutîndu-ne în acest scop de flacăra de veghe a unui bec Bunsen, cu care spargem bulele de gaz care au tendința să se urce spre dop. La terminarea efectuării vidului se închide tubul de cultură, porțiunea sa efilată.

Aparatul Zeissler este de asemenea folosit. Aparatul este format dintr-un cilindru de sticlă foarte rezistentă și un capac prevăzut cu un robinet. Se introduc în interiorul cilindrului plăcile şi tuburile cu mediu însămînţate, fiind ulterior acoperite cu capacul prevăzut cu robinet. Pentru a se asigura etanşeitatea aparatului, se introduce între capac şi marginea superioară a cilindrului un inel de cauciuc, uns cu vaselină pe ambele părţi.

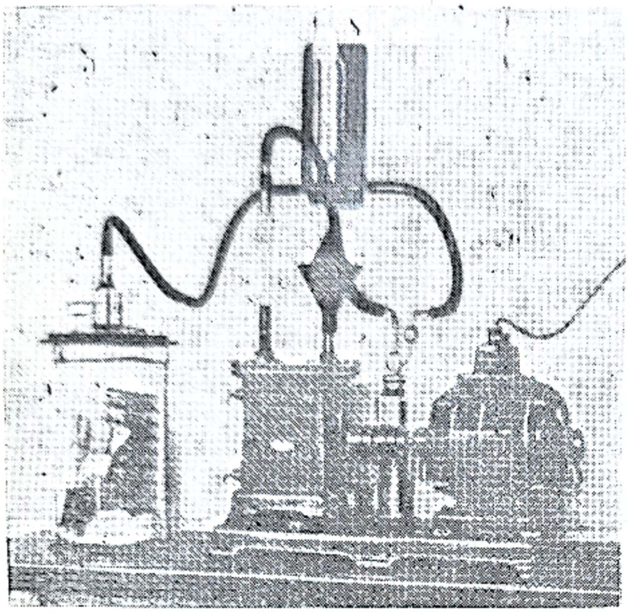


Fig. 141. — Aparat Zeissler adaptat la pompă de vid.

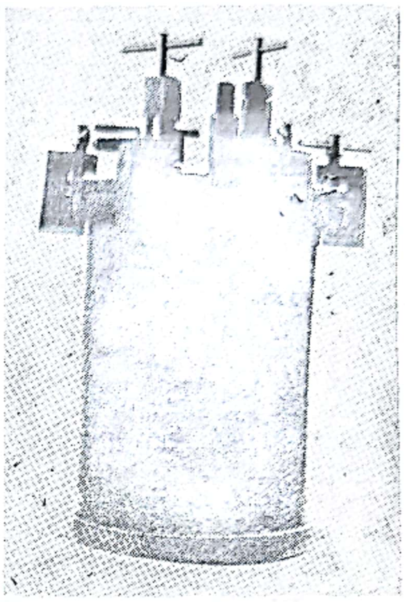


Fig. 142. — Aparatul McIntosh.

Aparatul, o dată încărcat cu mediile însămînţate, este ataşat la o pompă de vid, cu robinetul deschis; se evacuează aerul (vid 730 — 740 mm Hg); se închide apoi robinetul şi se trece pentru incubare în termostat.

McIntosh a descris un aparat asemănător aparatului Zeissler, însă mult îmbunătăţit. Aparatul, construit din metal, prezintă pe suprafaţa exterioară a capacului două orificii (două robinete). Unul este folosit pentru evacuarea aerului cu ajutorul unei pompe de vid, iar celălalt serveşte pentru introducerea de hidrogen, după evacuarea aerului. Pe suprafaţa interioară a capacului se găseşte un mosorel, care prezintă o sîrmă de platină răsucită, ale cărei capete trec la exterior prin peretele capacului. După încărcarea aparatului cu mediile de cultură însămînţate, se ataşează capacul, se evacuează aerul, se introduce hidrogenul, iar cu ajutorul unui curent electric se obţine înroşirea sîrmei de platină. Platina înroşită catalizează ultimele urme de oxigen în prezenţa hidrogenului, formînd apă şi determinînd în acest fel o anaerobioză perfectă.

2. **Metode chimice.** Aceste metode folosesc anumite substanţe chimice, care sînt absorbante sau reductoare.

a) Ca substanţă absorbantă se foloseşte în special pirogalolul în prezenţa hidroxidului de sodiu.

Procedeul Wright: tuburi cu geloză-sînge, înclinată, sînt însămînţate cu produsul patologic de cercetat. Se înfundă apoi dopul de vată în interiorul tubului, cît mai mult posibil, dar în aşa fel, ca partea inferioară a dopului de vată să nu atingă mediul însămînţat. Se adaugă apoi deasupra dopului de vată 0,5 g acid pirogalic și 0,8 ml soluție saturată de hidroxid de sodiu. Deasupra se adaugă un dop de cauciuc.

Adăugarea pirogalolului și a hidroxidului de sodiu trebuie făcută foarte repede și în așa fel, ca apa de condensare a tubului însămînțat să nu ajungă la dopul de vată în timpul manoperei, iar hidroxidul de sodiu cu pirogalolul să nu ajungă în mediile de cultură. Tuburile astfel preparate se incubează numai vertical și cu dopul de cauciuc în jos.

b) Dintre substanțele reductoare sînt de asemenea des folosite mai ales cisteina, glucoza, sulfiții, glutationul, piruvatul de sodiu, acidul ascorbic, sulfura de calciu, acidul tioglicolic sau tiolactic. Substanțele sînt înglobate în medii lichide, în proporții convenabile, după ce, în prealabil, acestea au fost regenerate.

Dacă agentul reductor este puternic, astfel cum sînt acizii tiolactic sau tioglicolic, nu se mai adaugă la suprafața mediului un mijloc de protecție a anaerobiozei.

Dăm unele exemple asupra concentrațiilor folosite pentru substanțe reductoare:

Acid tioglicolic 0,6 ml pentru 1 000 ml mediu.

Piruvat de sodiu 2 g pentru 1 000 ml mediu.

3. **Metode biologice.** *a*) Cultivare în prezența germenilor aerobi: într-o cutie Petri, cu geloză-sînge, se face un șanț în lungul unui diametru, cu ajutorul unei spatule sterile. Pe o jumătate de mediu se însămînțează în pînză continuă un germen puternic aerob, cum este bunăoară *Serratia marcescens* (*B. prodigiosus*) iar pe cealaltă jumătate, germenii anaerobi de studiat. Se răstoarnă cutia și se introduce între capacul și fundul cutiei Petri o cantitate de plastilină, astfel ca întreg acest spațiu să fie umplut. B. *prodigiosus* dezvoltîndu-se rapid, consumă oxigenul din interiorul cutiei, permițînd astfel creșterea germenului anaerob.

b) Adăugarea de fragmente de țesuturi animale. Procedeul Tarozzi este uneori recomandat. De la un animal sănătos (iepure, cobai), sacrificat, se prelevează ficatul, splina și rinichii, din care se fac fragmente cubice, cu latura de 1 cm. Aceste cuburi sînt introduse steril în bulionul regenerat și răcit. Se incubează 48 de ore la 37°, pentru controlul sterilității. Se însămînțează și se incubează timp potrivit.

Carnea tocată și eventual prăjită este adăugată în volum de 1/8 în mediu. Carnea tocată posedă o intensă acțiune de reducere, în afară de faptul că în compoziția sa se află factorii de creștere, așa de numeroși, ceruți de germenii din genul *Clostridium*.

c) Adăugarea de fragmente de țesuturi vegetale (procedeul Glotova și Vagmistrova). În tuburi obișnuite, cu 8 ml bulion glucozat 2%, se adaugă 0,1 g vată. Se autoclavează 30 de minute la 110°. Înainte de însămînțare se regenerează mediul. Datorită gazelor care se produc în timpul cultivării germenilor anaerobi, vata se ridică la suprafața mediului, realizînd, în acest fel, o protecție mecanică.

Pretecția anaerobiozei

În tuburile de cultură protecția anaerobiozei se obține prin:

a) adăugarea de ulei de parafină (vaselină) deasupra nivelului mediului pe o înălțime de 1,5 — 2 cm;

b) adăugarea pe aceeaşi înălţime, de parafină fuzibilă la 56 — 60°.

Atît uleiul de vaselină, cît şi parafina se sterilizează la 180°, timp de o oră. În momentul folosirii, parafina se topeşte la baie şi se adaugă steril cu ajutorul unei pipete Pasteur.

Procedeul Hall : tuburi de sticlă, care prezintă gîtuiri circulare la o înălţime de 5—6 cm de la extremitatea inferioară a tubului, au prevăzut o mărgea de sticlă în interiorul şi deasupra gîtuirii. Mediul trebuie să depăşească cu 3—4 cm nivelul mărgelei. Se regenerează, se însămînţează aplecînd astfel tubul, ca să se poată obţine deplasarea mărgelei, şi se incubează vertical, pentru ca mărgeaua de sticlă să obtureze orificiul interior.

c) Geloză 5‰ glucozată 2%, în coloană, în tuburi Weinberg.

d) Reducerea suprafeţei de contact cu aerul. Spre pildă, baloane în care mediul se ridică pînă la jumătatea gîtului balonului.

Aparatul McIntosh, aparatul Zeissler, eventual exsicatoare etanşe etc.

Prepararea mediilor de cultură

1. *Bulion-albuş de ou*

Carne de viţel	500 g
Peptonă	10 g
NaCl	5 g
Apă	1 000 ml
Glucoză	2 g

Se macerează carnea la rece 24 de ore, se fierbe 30 de minute. Se dizolvă peptona şi NaCl în zeama de carne. Filtrare prin hîrtie, pH 7,8. Sterilizare la 120° 30 de minute. Se adaugă glucoza şi se repartizează în tuburi cîte 25 ml, punînd în prealabil, cîte un cub de albuş de ou (coagulat) cu latura de 1 cm. Se adaugă 2 ml ulei de vaselină. Se sterilizează la 105—110°,20 de minute.

La utilizare se regenerează prin fierbere.

2. *Agar semisolid* 5‰

Carne de viţel	500 g
Peptonă	10 g
NaCl	5 g
Agar	5 g
Apă	1 000 ml

Se dizolvă, la cald, în zeama de carne, peptona, sarea şi agarul. Se aduce la volum; pH 7,8. Filtrare prin hîrtie. Repartiţie în tuburi Weinberg, cîte 5 ml. Sterilizare la 115°. Pentru utilizare, mediul este topit şi răcit la 40—45°.

3. *Geloză-sînge (Mediul Zeissler)*

Geloză peptonată, pH 7,2—7,4 încălzită la 50°	100 ml
Glucoză, soluţie 20%, sterilă	10 ml
Sînge defibrinat de berbec, vită mare sau cal	15—20 ml

Se amestecă, se repartizează în cutii Petri, se usucă 5—7 ore la 37°, sau 48 de ore la temperatura camerei.

Săsărman şi Horodniceanu, adaugînd mediului Zeissler 250 γ neomicină pe ml obţine un mediu foarte selectiv pentru izolarea *Cl. perfringens*.

4. *Mediul Kondratieva* (pentru identificarea *Cl. welchii*)

Lapte pulbere	8 g
Peptonă	10 g
NaCl	5 g
Glucoză	1 g
Sulfit de sodiu	6 g
Apă sterilă	1 000 ml

Se repartizează în tuburi, se încălzește în baia de apă la 100°, 15–30 de minute. După răcire se adaugă clorură de fier (2 picături din soluția 2,7% la un tub).

În prezența *Cl. welchii*, după 1–10 ore de incubare la 37° se produce înnegrirea mediului.

Cl. septicum, *Cl. histolyticum*, *Cl. sporogenes*, *Cl. oedematiens Cl. mesentericus*, *Esch. coli*, *B. proteus* , *B. friedländeri*, *B. anthracis*, stafilococul auriu, streptococul hemolitic dau reacții negative; unele tuburi de bacili coli dau reacții pozitive numai după 24 de ore.

5. *Bulion VF*

Carne de vițel	100 g
Ficat de vițel	500 g
Stomac de porc	600 g
Apă de robinet încălzită la 55°	500 ml
Acid clorhidric	50 ml

Se amestecă totul într-un vas pentru digestie. Amestecul este lăsat 22–24 de ore la 50°. Se încălzește 15 minute la 80°, pentru întreruperea digestiei. Se decantează, se filtrează prin pînză de sac. Se aduce la pH 7,8 pentru *Cl. welchii*, *Cl. septicum*, *Cl. histolyticum* și la pH 7,9 pentru *Cl. oedematiens*. Fierbere 30 de minute, refiltrare prin hîrtie. Repartizare în baloane (pentru obținere de toxină), iar pentru treceri, în tuburi Pyrex 20/20, în care se adaugă 2 ml ulei de vaselină sterilizată la 180°, 30 de minute.

Tehnica însămînțării

Materialele sau produsele patologice de însămînțat, în cazuri de toxiinfecții alimentare, pot fi: alimente crude, conserve alimentare, lapte, materii fecale, fragmente de organe ridicate la necropsie etc.

Materialelor și produselor solide li se adaugă mai întîi soluție cloruro-sodică izotonică și ulterior sînt triturate în mojar; cele lichide se folosesc ca atare.

Produsul, oricare ar fi el, se împarte în două: una din părți se însămînțează pe geloză ordinară sau geloză-sînge, incubată în aerobioză, pentru izolarea și identificarea germenilor aerobi care trăiesc în asociație cu germenii anaerobi; cealaltă parte este încălzită la 80°, timp de 20 minute, cu scopul distrugerii germenilor nesporulați și a formelor vegetative sporulate. Însămînțarea se face în medii lichide, introducînd, după caz 0,1–0,5 ml din diferitele produse patologice în studiu. Deoarece în tehnica obișnuită de însămînțare totdeauna se află la vîrful pipetei Pasteur o cantitate mică de aer, de astă dată introducerea pipetei în mediu este însoțită mai întîi de aspirația mediului de însămînțat în pipetă, astfel ca să se stabilească un contact continuu între mediu și conținutul pipetei, și apoi se lasă întregul produs de însămînțat să cadă în fundul tubului.

O îmbunătăţire a tehnicii în vederea izolării *Cl. perfringens* a fost adusă de Săsărman şi Horodniceanu prin introducerea etapei de îmbogăţire a materialului însămînţat. Procedeul constă în incubarea tuburilor însămînţate la 46—47°, această temperatură jucînd rol de factor selectiv (inhibă flora de asociaţie). Durata incubaţiei este de 5—24 de ore (incubarea la temperatura indicată fiind oprită o dată cu apariţia în culturi a primelor bule de gaz).

Tehnica izolării

Din tuburile însămînţate după tehnica anaerobă şi incubate (creşterea se urmăreşte uneori timp de 10 zile) se fac treceri la fiecare 24 de ore pe medii cu geloză moale în tuburi Weinberg sau pe medii care permit izolarea în suprafaţă.

În cazul folosirii tuburilor Weinberg, trecerile se fac în modul următor : se prepară 2—3 tuburi cu 10 ml ser fiziologic. Cu pipeta Pasteur se ia o picătură din cultură şi se trece într-unul din tuburile cu ser fiziologic. Se omogenizează. Se ia cu altă pipetă o picătură din acest tub şi se trece în al doilea tub ; se omogenizează. Cu o nouă pipetă Pasteur se ia din tubul ultim şi se trece pe o serie de tuburi Weinberg cu geloză 5‰ trecînd din tub în tub, schimbînd pipeta cît mai des. Seria este formată de obicei din 10—12 tuburi. Se incubează la 37°, urmărindu-se trecerile cîteva zile. Tuburile care posedă colonii izolate sînt tăiate cu pila puţin deasupra nivelului coloniei, după ce mai întîi s-a sterilizat cu alcool suprafaţa exterioară a tubului.

Colonia sau coloniile izolate sînt trecute, fie în bulion-ou, fie în bulion-carne sau, eventual, pe alte medii ca mediul Zeissler, cu sau fără neomicină şi obligatoriu pe medii aerobe, pentru a se identifica eventual germenii aerobi facultativi.

Pentru izolarea germenilor anaerobi patogeni, produsele se mai pot inocula intramuscular la animale de laborator (în special la cobai), care fac abcese sau alte localizări în organe de unde anaerobii patogeni sînt uşor de izolat ulterior pe medii uzuale.

Tehnica de numărare a sporilor vii

Se foloseşte mai des tehnica preconizată de către Tenbroeck şi Bauer. Din diferite diluţii de cultură, încălzite 15 minute la 75° (suspensii de spori), se ia cîte 1 ml, care se amestecă bine cu 5 ml geloză-ficat, topită şi menţinută la 45°. Se învîrtesc tuburile în gheaţă, pentru a se solidifica geloza în pătură subţire şi regulată pe suprafaţa internă a tuburilor. Ulterior se umplu tuburile cu geloză topită la 45°, depăşindu-se în înălţime pătura subţire de geloză etalată anterior. Se răcesc în gheaţă şi se incubează la 37°. După 24 de ore apar colonii microbiene uşor de reperat şi de numărat.

Tehnica determinării sensibilităţii faţă de antibiotice a germenilor anaerobi

Se întrebuinţează mediul VF, căruia i se adaugă 2% geloză şi 0,6‰ acid tioglicolic şi cutii Petri sterilizate cu capacele unul într-altul. Pentru determinarea sensibilităţii unei tulpini, se însămînţează 0,5 ml dintr-o cultură tînără la 50 ml mediu topit (pentru *Cl. oedematiens* se folosesc 1—2 ml), care se toarnă într-o cutie Petri cu diametrul de 15 cm, la momentul indicat de terminarea fazei următoare.

Pe capacul întors al unei plăci Petri sterile se depun rondelele de hîrtie de filtru, cu diametrul de 5 mm, peste care se aplică, cu ajutorul unei anse de platină, a cărei buclă are diametrul de 2 mm, cîte o picătură din diferitele soluţii de antibiotice pentru care vrem să stabilim sensibilitatea tulpinii de cercetat.

O dată terminată această operaţie, se fixează rondelele cu antibiotice de fundul capacului cu ajutorul unei picături de geloză caldă, după care se aplică direct pe geloza însămînţată şi turnată în cutia Petri în aşa fel, ca să nu cuprindă bule de aer. Incubaţie la 37°, citirea rezultatelor făcîndu-se între 18 şi 36 de ore.

Ordinul Spirochaetales

Dr. Mihai Sefer

Clasificare. În acest ordin sînt cuprinse microorganisme filamentoase de 6—500 μ lungime, spiralate, mobile şi vizibile la microscopul cu fond întunecat. În natură se găsesc în stare saprofită sau parazitară.

În acest ordin se găsesc două familii:

— familia *Spirochaetaceae* care cuprinde spirochete saprofite cu protoplasmă septată şi cu lungime mare (30—500 μ);

— familia *Treponemataceae* care cuprinde spirochete saprofite şi patogene fără structură protoplasmatică, cu o lungime de 3—20 μ.

Familiei *Spirochaetaceae* îi aparţin următoarele genuri:

1. Genul *Spirochaeta*, fără striaţii şi membrană.
2. Genul *Saprospira*, cu membrană şi striaţii protoplasmatice.
3. Genul *Cristispira* care prezintă o creastă laterală.

Familia *Treponemataceae* este formată din următoarele genuri:

1. Genul *Borrelia*.
2. Genul *Leptospira*.
3. Genul *Treponema*.

Din punct de vedere medical interesează în special spirochetele din familia *Treponemataceae* care joacă un rol important în patologia umană şi animală.

Caracterele generale ale spirochetelor din familia Treponemataceae

Istoric. Prima boală la om, produsă de spirochete, a fost observată de Obermeyer în 1873, cunoscută sub numele de febra recurentă. În 1888, Sackaroff descrie spirochetoza păsărilor (*Spirillum anserinum*). În următorii 30 de ani, bacteriologii descoperă că numeroase boli la om şi animale sînt provocate de spirochete: angina Vincent, sifilisul, boala pian, boala Weil, febra de mîl etc.

Habitat. Spirochetele saprofite se întîlnesc în cavităţile naturale ale omului şi animalelor, în apă şi sol umed. Spirochetele patogene se găsesc în organismul uman (*Treponema pallidum* şi *Tr. pertenue*, *Borrelia recurrentis* şi *Borr. duttoni*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* etc.) sau în organismele animalelor şi insectelor (Leptospirele patogene, *Treponema cuniculi*, diferite specii de *Borrelia*).

Caractere morfologice şi tinctoriale. Spirochetele patogene au lungimea de 2—50 μ. Protoplasma este helicoidală, răsucită pe un filament axial (*Leptospira*) sau pe un grup de filamente axiale (*Borrelia* şi *Treponema*) şi fiind învelită de o membrană celulară. Spirochetele se colorează atît prin metode speciale: metoda Giemsa şi impregnarea argentică, cît şi cu soluţii apoase din coloranţii de anilină. În preparate proaspete, spirochetele, vizibile la microscopul cu fond întunecat, sînt mobile, prezentînd mişcări vii de rotaţie, flexie şi translaţie. Reproducerea se face prin diviziune transversală izo- sau anizotipică. Nu se cunoaşte o modalitate de înmulţire sexuată şi nici un ciclu evolutiv. Granulele, aşa-zise spirochetogene — observate la *Borrelia*, *Treponema* şi *Leptospira* în special — par să fie forme de degenerare.

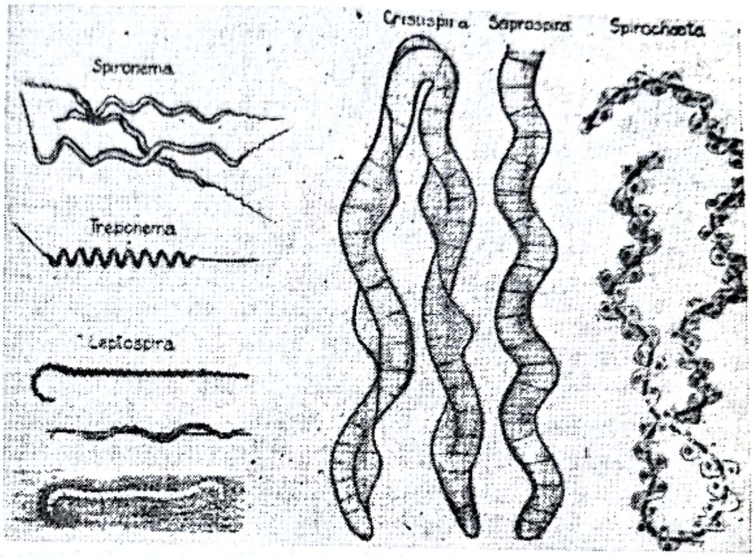


Fig. 143 — Tipuri de spirochete (Zinsser).

Caractere de cultură. Noguchi a descris primul mediu semisolid pentru cultivarea spirochetelor. Boreliile şi treponemele patogene cultivă greu şi necesită condiţii de strictă anaerobioză. Pînă în prezent nu s-au putut face treceri în subculturi de *Treponema pallidum*. Leptospirele se cultivă uşor pe medii lichide şi semisolide în aerobioză.

Caracterele biochimice şi de metabolism sînt puţin studiate.

Rezistenţa la agenţi fizici, chimici şi biologici. Este asemănătoare formelor vegetative ale bacteriilor. Sînt lizate de bilă şi saponină, de penicilină. Sînt omorîte la 56—60°, în 10 —15 minute. Lumina şi uscăciunea le omoară instantaneu. Vitalitatea germenilor din genurile *Borrelia* şi *Treponema* se conservă prin liofilizare.

Structura antigenică. A fost bine studiată la leptospire. Pe baza înrudirii antigenice s-a putut elabora o clasificare ştiinţifică a numeroaselor tulpini de *Leptospira* patogene, izolate de la om şi animale. Structura antigenică a treponemelor şi boreliilor este insuficient studiată din cauza dificultăţii de a obţine culturi pure.

Caractere de patogenitate. Patogenitatea spirochetelor este legată de virulenţă. Deşi există observaţii care sugerează prezenţa toxinelor (leziuni toxice la nivelul ficatului şi rinichiului), pînă în prezent nu s-a descris nici o substanţă cu caractere toxice produsă de spirochete sau legată de constituţia chimică a celulei bacteriene.

Boala spontană la om şi animale. Se caracterizează prin septicemie, cu leziuni nesupurative, la nivelul vaselor, rinichiului, ficatului şi meningelor. Evoluţia clinică este ciclică, febra alternînd cu perioade de apirexie.

Infecţia experimentală. Pentru reproducerea experimentală a bolilor provocate de spirochetele patogene se folosesc ca animale sensibile: maimuţa şi iepurele, pentru genul *Treponema*; şoarecele alb şi şobolanul, hamsterul şi maimuţa pentru genul *Borrelia*; cobaii, iepurii şi hamsterii pentru genul *Leptospira*.

Imunitate. Oamenii sau animalele trecute prin boală devin imune. Imunitatea dobîndită este strict omologă şi de scurtă durată.

Tratamentul specific. Dintre spirochetoze, numai leptospirozele beneficiază de un tratament cu seruri imune de tip sau de grup. Antibioticele, în special penicilina, au o largă aplicare şi dau rezultate foarte bune în tratamentul etiologic al spirochetozelor.

Diagnosticul de laborator. Se bazează pe evidenţierea agentului patogen şi izolarea lui prin cultivare pe medii (*Leptospira*) sau prin inoculare la animale sensibile (*Treponema*, *Leptospira* şi *Borrelia*). Reacţiile serologice sînt larg folosite în diagnosticul treponematozelor şi leptospirozelor.

Epidemiologie. Sursa de infecţie în treponematoze o constituie omul bolnav; în borelioze — omul bolnav, diferite răzătoare, păduchele şi căpuşa; în leptospiroze — rozătoarele sălbatice şi animalele domestice.

Calea de transmitere este directă în sifilis şi alte treponematoze, cu excepţia bolii *pinta* (*Tr. carateum*), unde transmisia este posibilă şi prin intermediul muştei *Hippelates pallips*. În borelioze, transmisia se face prin vectori: păduchele uman şi diferite specii de căpuşă. În leptospiroze, calea de transmitere este directă şi mai frecventă prin intermediul apei, alimentelor etc.

Spirochetozele sînt răspîndite pe tot globul, frecvenţa lor în diferite regiuni fiind influenţată de factori geografici şi sociali.

Profilaxie. Prevenirea îmbolnăvirilor prin spirochete presupune pe de o parte, un personal medical specializat care să depisteze şi să pună un diagnostic precoce, să izoleze, să trateze bolnavii şi să facă educaţia sanitară a populaţiei, iar pe de altă parte să existe condiţiile economice-sociale care să permită eficienţa muncii corpului medical şi a acţiunilor de masă: deratizarea, deparatizarea etc.

Rezultate bune au dat vaccinările în prevenirea leptospirozelor la grupele profesionale expuse infectării cu leptospire (mineri, orezari, crescători de animale etc.).

Vaccinurile încercate pînă în prezent în prevenirea treponematozelor şi boreliozelor nu s-au dovedit eficace.

Genul Borrelia

Numele genului vine de la cercetătorul francez Borrel. Cuprinde spirochete de 8—20 μ lungime, cu spire largi şi neregulate. Se colorează uşor cu coloranţii de anilină. În preparate proaspete sînt vizibile şi la microscopul obişnuit. Au fost izolate numeroase specii de *Borrelia*, dintre care unele sînt patogene pentru om şi animale. De obicei sînt hematofite, dar se găsesc şi pe membrane şi mucoase. O parte din ele sînt transmise de artropode.

Clasificare. Germenii din acest gen se împart în :

1. Borelii patogene pentru păsări (*B. anserina*)
2. Borelii patogene pentru om, transmise prin :
   a) păduche (*B. recurrentis*, *B. berbera* şi *B. carteri*);
   b) căpuşă (*B. hispanica*, *B. duttoni*, *B. turicatae* etc.).
3. Borelii saprofite, găsite pe mucoasa bucală sau genitală la om (*B. buccalis*, *B. vincenti* şi *B. refringens*).
4. Borelii găsite numai la insecte sau căpuşe (*B. glossinae*, *B. dugessii* etc.)
5. Borelii găsite la şoareci (*B. crocidurae*, *B. dipodilli* etc.).
6. Borelii izolate de la porci (*B. hyos*).
7. Borelii izolate de la rumegătoare (*B. theileri*).
8. Borelii izolate de la primate (*B. harveyi*).

Istoric. Febrele recurente sînt provocate de specii de *Borrelia*, morfologic identice, distincte însă prin comportarea diferită faţă de animalele de laborator şi puternica specificitate faţă de vectorul corespunzător; febrele recurente epidemice sînt transmise prin păduche, iar cele endemice prin căpuşă. După Brumpt, infecţia primară ar fi fost la artropode, de la care a trecut la rozătoare şi apoi la om. Sparrow (1955—1957), cercetînd febrele recurente în Abisinia, nu reuşeşte să adapteze *B. recurrentis* la căpuşe. Pînă în prezent nu se cunoaşte decît un singur caz în care *Borrelia hispanica* a suferit o mutaţie, dobîndind o afinitate pentru păduche.

Febra recurentă epidemică este cunoscută de foarte multă vreme (fiind citată de Hippocrate), dar apare în epidemiologie sub acest nume abia în 1843 (Craigie şi Henderson). În anul 1873, Obermeyer descrie spirochetele observate de el încă din 1868 în sîngele unui bolnav. Confirmarea etiologică este dată de Minch şi Mecinikov care se infectează experimental. În 1908, Sergent şi Folley evidenţiază rolul de vector al păduchelui în febra recurentă, iar Nicolle (1912) confirmă experimental etiologia şi vectorul febrei recurente epidemice. Febrele recurente transmise prin căpuşă au fost observate din 1857 de Livingston în Africa tropicală. În 1905, Dutton şi Todd arată rolul de vector al căpuşelor.

Habitat. *Borrelia recurrentis*, *carteri* şi *berberi* se găsesc în *Pediculus pediculus* şi în sîngele omului bolnav de febră recurentă. *Borrelia hispanica*, *duttoni*, *parkeri* etc. se găsesc în căpuşe şi în sîngele omului bolnav.

Caractere morfologice şi tinctoriale. Genul *Borrelia* este format din microorganisme filamentoase, spiralate, cu spire largi şi neregulate, cu o lungime de 8—20 μ, foarte mobile. *B. duttoni*, studiată de Kawata (1961) în secţiuni fine la microscopul electronic, prezintă un perete celular format dintr-o dublă membrană, citoplasmă cu structuri filamentoase şi granulare şi un fascicul de 20—25 fibrile la suprafaţa peretelui celular. Se colorează uşor cu coloranţii de anilină (Gram-negativ). Se constată diferenţe morfologice după mediul în care s-au dezvoltat. În sîngele de om şi animale se prezintă la început izolate, apoi aglutinate în formă de steluţe cu capetele libere şi mobile. După puţin timp, devin imobile, cu contururi şterse, granuloase, suferind un proces de liză, pînă la dispariţia completă. La păduchi, boreliile se dezvoltă uniform, menţinîndu-şi morfologia intactă în tot timpul vieții. Aspectele morfologice diferite pe care le prezintă boreliile în sîngele omului și animalelor sînt explicate prin procesul imunologic.

Caractere de cultură. Se cultivă în mediul Noguchi, format din ascită cu ser de iepure, sub parafină. Se dezvoltă slab după o incubare de 7—9 zile, la temperatura de 30—37°. Cea mai bună metodă pentru cultivarea boreliilor o constituie inocularea păduchilor (Weigl). Boreliile nu omoară păduchele, se înmulțesc în cultură pură și își mențin virulența. Pentru cultivarea și izolarea boreliilor s-au utilizat embrionii de găină în vîrstă de 12—16 zile, inoculați intraalantoidian. Boreliile apar în sînge în a 20-a — a 21-a zi. Mai pot fi folosiți șoarecii și șobolanii nou-născuți, de 2—5 zile. După o scurtă perioadă septicemică, boreliile persistă în creierul acestor animale timp îndelungat.

Caractere biochimice și metabolice. Boreliile au nevoie de o cantitate mică de oxigen, fermentează glucoza producînd bioxid de carbon și acid lactic și au o ușoară activitate de dehidrogenare (Scheff, 1959). Metabolismul lor este foarte puțin cunoscut.

Rezistența la agenți fizici, chimici și biologici. Sensibilitatea la agenții fizici și chimici este asemănătoare cu cea a formelor vegetative ale bacteriilor. În serul recoltat la începutul perioadei febrile și păstrat la +4° se mențin vii și virulente cîteva săptămîni. Dacă sîngele este lăsat la 20°, boreliile rezistă 6 zile. La 0° rezistă 100 de zile. Congelarea la —72° menține viabilitatea lor cel puțin 2 ani. Sînt foarte sensibile la penicilină, cloromicetină și aureomicină.

Structura antigenică. În evoluția unei febre recurente, spirochetele izolate în timpul acceselor repetate prezintă o structură antigenică deosebită. Există variante antigenice și în raport cu vectorul (păduche sau căpușă). După unii autori, *Borrelia recurentis*, *carteri* și *berbera* ar aparține aceluiași serotip diferențiat din punct de vedere geografic (Europa, India, Africa).

Caractere de patogenitate. *Borrelia recurrentis* provoacă îmbolnăvirea gravă a maimuțelor; nu omoară păduchele, șoarecii și embrionul de găină. *Borrelia duttoni* este patogenă pentru șoarecele alb, iar *Borrelia hispanica* — pentru șoarece, cobai și șobolan. Virulența variază în funcție de mediul de cultură; scade prin treceri succesive pe animale și nu se modifică prin treceri repetate pe păduche.

Boala spontană la om și animale. Omul face boala după 5—7 zile de incubație. Debutul este brutal, cu cefalee violentă, febră 41°, epistaxis, spleno și hepatomegalie, icter. După 6—7 zile urmează criza, apoi apirexia și recăderile care se succed la intervale de 7—9 zile. Boala este anergizantă. Mortalitatea este de 6—30%. Predomină leziunile necrotice și proliferative în splină, ficat și rinichi (Nasu, 1959).

Infecția experimentală. Animalele sensibile la infecția cu *Borrelia* sînt: maimuța, șoarecele, șobolanul și hamsterul. În special șoarecii și șobolanii de 2—5 zile dau rezultate constante. După o incubație de 4—5 zile apare o scurtă fază septicemică (24 de ore). Boreliile persistă în creierul acestor animale pînă la un an de zile.

Imunitate. După infecție se obține o imunitate omologă și de scurtă durată. Reinfecția este posibilă chiar după cîteva luni (6 luni), în mod obișnuit după 2—3 ani. Imunitatea strict omologă permite diferențierea variantelor antigenice. Slaba imunizare din febrele recurente explică apariția numeroaselor recidive. (Cercetătorul sovietic Latasev a făcut de 5 ori febră recurentă). Prezenţa anticorpilor poate fi dovedită reproducînd în mod experimental fenomenul Pfeiffer la şobolanii vindecaţi de febră recurentă.

Tratamentul specific. Seroterapia nu are aplicare practică în tratarea febrelor recurente. Pe lîngă tratamentul cu compuşii arsenicali (neosalvarsan sau arsenobenzol), penicilina, cloramfenicolul şi aureomicina completează arsenalul terapeutic.

Diagnostic de laborator

Urmăreşte în primul rînd evidenţierea şi izolarea spirochetelor din sîngele periferic în puseurile febrile, iar în al doilea rînd decelarea anticorpilor fixatori şi aglutinanţi în serul convalescenţilor. Se folosesc :

1. **Metode directe :** a) examinarea plasmei sanguine recoltate de la bolnav în perioada acceselor febrile în preparat proaspăt, între lamă şi lamelă, la microscopul cu fond obscur ;

b) examinarea frotiurilor sanguine, colorate cu fucsină fenicată şi diluată 1/10 sau după metoda Giemsa.

2. **Metode indirecte :** a) inoculare de sînge intraperitoneal la şoarece sau şobolan în vîrstă de 3—5 zile (test biologic) ;

b) reacţii serologice : cercetarea anticorpilor aglutinanţi prin punerea în contact a serului de cercetat cu culturi de *Borrelia* (reacţie de aglutinare) ; cercetarea anticorpilor fixatori prin reacţia de fixare a complementului, introdusă de Zlatogorov. Ca antigen se foloseşte splina de şoarece infectat sau culturi de *Borrelia* obţinute pe embrioni de găină.

S-a constatat că serurile bolnavilor de febră recurentă, ca şi serurile bolnavilor de rickettsioză Tsutsugamushi dau reacţii de aglutinare pozitive cu *Proteus OXK*.

Epidemiologie

Febra recurentă, transmisă prin păduche, cunoscută şi sub numele de febră recurentă cosmopolită, apare sub formă epidemică în perioadele de foamete sau război, însoţind de obicei epidemiile de tifos exantematic. Vagabonzii şi migraţiunile în masă au constituit factori favorizanţi în extinderea bolii.Sînt cunoscute trei mari epidemii de febră recurentă transmisă prin păduche : 1) epidemia din anii 1919—1923 din Rusia şi Europa centrală ; 2) epidemia din 1920 —1930 din Africa occidentală şi ecuatorială ; 3) epidemia din 1943—1945 din Africa de nord şi ţările mediteraneene. În ţara noastră, boala a fost eradicată în 1948. Incidenţa sezonieră urmează pe cea a tifosului exantematic, atingînd maximul în lunile reci, cînd condiţiile de înmulţire a păduchilor sînt optime. Morbiditatea este variabilă în funcţie de parazitism. Contagiozitatea este mult mai mică decît a tifosului exantematic. Letalitatea este în mod normal de 3—6% , putînd atinge şi 50%.

Rezervorul de virus şi gazda obligatorie pentru febra recurentă cosmopolită sînt omul şi păduchele ; pentru febra recuretă endemică, căpuşa, rozătoarele şi omul. Bolnavul elimină spirochete prin hemoragii nazale, urini sanguinolente, sînge menstrual etc.

Agentul vector în febra recurentă epidemică este păduchele (*Pediculus humani*) care se infectează, sugînd sînge de la omul bolnav. După 24 de ore, spirochetele trec din stomacul păduchelui în cavitatea celomică, unde se înmulțesc și în timp de 6—8 zile invadează tot organismul. Transmiterea se face prin strivirea păduchelui, care permite ieșirea lichidului celomic, bogat în spirochete. Boreliile pătrund prin pielea iritată sau cu fine excoriații. Contaminarea poate avea loc și pe cale conjunctivală, prin frecarea ochiului cu mîinile infectate după strivirea păduchilor sau stropirea cu material infectant.

În transmiterea febrelor recurente endemice au fost descrise diferite specii de căpușe : *Ornithodorus erraticus* (Spania) ; *O. hermsi* (Columbia).*O. moubata* (Africa), *O. parkeri* (S.U.A.) etc. Căpușele păstrează boreliile ani de zile și le transmit transovarian din generație în generație. Ele parazitează de regulă rozătoarele. În U.R.S.S., Pospelova clasifică focarele de borelioză transmise prin căpușă în focare naturale, care se caracterizează prin existența de numeroase specii de căpușe și focare rurale, unde se găsește numai o singură căpușă — *Ornithodorus tholozani*.

Profilaxie. Măsurile profilactice se adresează individului bolnav (sau contact) și colectivității. Ele constau în depistarea precoce a bolnavilor, declararea și izolarea lor, deparazitare și deratizare.

Factorii economici-sociali, ridicarea nivelului de trai material și cultural al popoarelor, lichidarea colonialismului, mizeriei și analfabetismului, înlăturarea războaielor sînt factori determinanți în profilaxia internațională a epidemiilor de febră recurentă.

Genul Leptospira

Noguchi (1918) grupează în genul Leptospira spirochetele cu spire fine și dese, foarte mobile, cu capetele îndoite în formă de cîrlig, care se deosebesc de spirochetele din genurile *Borrelia* și *Treponema* prin proprietățile de cultură.

Clasificare. Izolarea unui număr din ce în ce mai mare de leptospire de la om, animale, artropode, apă, a condus în mod necesar la cercetarea și adaptarea unui criteriu științific pentru clasificarea lor în cadrul genului.

Dintre toate criteriile propuse și experimentate ca : patogenitate, protecție încrucișată, gazda animală (habitat), formele clinice etc. s-a impus drept criteriu cu valoare științifică, tocmai prin stabilitatea sa, structura antigenică.

Privitor la originea numeroaselor leptospire existente s-au emis două teorii :

a) teoria unicistă susținută de Baerman și Zuelzer după care leptospirele constituie o singură specie, cele saprofite transformîndu-se în leptospire patogene prin adaptări succesive timp îndelungat pe diferite gazde animale.

b) teoria dualistă enunțată de Van Riel după care în natură se află două specii de leptospire fără legătură între ele : specia saprofită și specia parazită.

Subcomitetul taxonomic pentru leptospire a propus ca genul leptospira să cuprindă două specii şi anume:

1. *L. interrogans*, care să reprezinte tulpinile parazite;
2. *L. biflexa* care să reprezinte leptospirele saprofite.

Specia *L. interrogans* se diferenţiază de specia *L. biflexa* prin: capacitatea de a parazita omul, animalele şi artropodele, necesitatea serului în medii pentru multiplicare *in vitro* şi sensibilitatea la ionii de cupru (nu se dezvoltă în prezenţa sulfatului de cupru 1/100 000).

Specia *L. biflexa* este saprofită, creşte şi pe medii fără ser, rezistă la acţiunea bacteriostatică a sulfatului de cupru 1/100 000 şi produce o cantitate mult mai mare de enzime (oxidază, ovolecitinază etc.)

Pe baza rezultatelor obţinute în reacţiile de aglutinare şi absorbţie încrucişată leptospirele din fiecare specie au fost încadrate în serotipuri cu structură antigenică diferită.

Pentru specia *L. interrogans* subcomitetul de experţi O.M.S. pentru leptospire a propus în 1962 o clasificare provizorie a celor 85 de serotipuri de leptospire patogene cunoscute pînă în prezent grupate — pentru motive practice — pe baza înrudirii antigenice în 13 serogrupuri.

Acest proiect de clasificare are la bază schema dată de Wolff în 1954, revizuită în 1956 (tabelul LXXVII).

Tabelul LXXVII

Schema de clasificare a leptospirelor patogene
(Specia *L. interrogans*)

	Grup serologic	Tip serologic	Tulpina tip
1.	*icterohaemorrhagiae*	*icterohaemorrhagiae*	RGA
		,,	M. 20
		,,	Mankarso
		,,	Ndahambukuje
		naam	Naam
		naam	Mwogolo
		naam	Dakota
		sarmin	Sarmin
		birkini	Birkini
		birkini	Smith
		ndambari	Ndambari
2.	*javanica*	*javanica*	Velgrat Batavia 46
		poi	poi
		coxus	Cox
		sofia	874
		celledoni	Celledoni
		celledoni	Whitcomb
3.	*canicola*	*canicola*	Hund Utrecht IV
		schüffneri	Vleermuis 90 c
		benjamin	Benjamin
		jonsis	Jones
		sumneri	Sumner
		malaya	H 6
		kamituga	Kamituga
		bafani	Bafani
		kahendo	Kahendo
		broomi	Patane
		bindjei	Bindjei

Tabelul LXXVII (continuare)

	Grup serologic	Tip serologic	Tulpina tip
4.	*ballum*	*balum*	Mus 127
		balum	Castellon 3
5.	*pyrogenes*	*pyrogenes*	Salinem
		zanoni	Zanoni
		abramis	Abraham
		biggis	Biggs
		hamptoni	Hampton
		alexi	HS 616
		robinsoni	Robinson
		manilae	LT 398
6.	*cynopteri*	*cynopteri*	3 522 C
		butembo	Butembo
7.	*autumnalis*	*autumnalis*	Akiyami A
		autumnalis	Rachmat
		autumnalis	Fort Bragg
		autumnalis	Nikolaevo
		bangkinang	Bangkinang 1
		erinacei-auriti	Erinacei auriti
		sentoti	Sentot
		mooris	Moores
		djasiman	Djasiman
		djasiman	Gurungi
8.	*australis*	*australis*	Ballico
		münchen	München C 90
		bratislava	Igel Bratislava
		fugis	Fudge
9.	*pomona*	*pomona*	Pomona
		pomona	C B
10.	*grippothyphosa*	*grippothyphosa*	Moskva V
11.	*hebdomadis*	*hebdomadis*	Hebdomadis
		hebdomadis	Nona
		kambale	Kambale
		kremastos	Kremastos
		worsfoldi	Worsfold
		jules	Jules
		borincana	H S —622
		kabura	Kabura
		mini	Sari
		mini	Szwajizak
		mini	LT 117
		hardjo	Hardjoprajitno
		wolffi	3 705
		medanensis	Hund HC
		sejroe	M 84
		sejroe	1 627 Burgas
		saxkoebing	Mus 24
		saxkoebing	Nero
		haemolyticus	Marsh
		haemolyticus	Richardson

Tabelul LXXVII (continuare)

	Grup serologic	Tip serologic	Tulpina tip
12.	*bataviae*	*bataviae*	Swart
		paidjan	Paidjan
		djatzi	HS 26
13.	*hyos*	*hyos*	Mitis Johnson
		hyos	LT 79
		hyos	RP 29
		atlantae	LT 81
		kisuba	Kisuba

Istoric. Boala Weil-Vasiliev era cunoscută încă din 1886. În 1913, Wolbach şi Binger izolează din apa lacului Boston primele leptospire nepatogene pentru animale şi om (*L.biflexa*). De-abia în 1914, Inada, Ido, Hoki, Kaneko şi Ito (Japonia) şi în 1916 Uhlenhuth şi Fromme (cercetători germani aflaţi în Franţa), izolînd de la bolnavi cu boala Weil-Vasiliev *Leptospira icterohaemorrhagiae*, stabilesc definitiv etiologia leptospirotică a acestei boli. În anii următori sînt izolate noi tipuri de leptospire, care precizează etiologia altor manifestări morbide, cunoscute clinic de multă vreme, ca : febra de 7 zile (*L. hebdomadis*, 1919), febra de mîl sau de apă (*L. grippotyphosa*, 1928), boala cîinilor din Stuttgart (*L. canicola*, 1931), boala tinerilor porcari (*L. pomona*, 1944) etc.

Habitat. Leptospirele patogene sînt frecvent întîlnite la rozătoarele sălbatice şi animalele domestice. Omul se infectează accidental. Localizarea specifică a leptospirelor o constituie tubii contorţi ai rinichiului, de unde sînt eliminate prin urină în mediule extern. Leptospirele saprofite şi uneori şi cele patogene se găsesc în apă şi sol mlăştinos cu pH uşor alcalin şi în condiţii ecologice favorabile. Prezenţa leptospirelor patogene în apă este explicată atît prin alimentarea apei cu leptospire eliminate de animalele purtătoare — în cea mai mare măsură — cît şi prin ipoteza multiplicării posibile a leptospirelor patogene în mediul extern.

Caractere morfologice şi tinctoriale. Leptospirele vii sînt vizibile la microscopul cu fond întunecat în preparate proaspete. Ele apar ca filamente subţiri, bine luminate, foarte mobile, cu spire strînse ca un şirag de perle şi cu capetele îndoite în formă de cîrlig. Mişcările spontane şi vii sînt de rotaţie în jurul axului longitudinal de flexiune şi translaţie. La microscopul optic, leptospirele devin vizibile numai după fixare şi colorare. Lungimea leptospirelor variază de la 6 la 40 μ, putînd atinge forme lungi de 150 μ şi forme scurte de 3 μ. Grosimea leptospirelor, de 0,06—0,12 μ, explică filtrabilitatea lor prin filtrele sterilizante Seitz EK, Chamberland L_3. Spirele sînt mici, egale, cu adîncime de 0,3 μ şi o amplitudine de 0,5 μ. În ultimii ani, morfologia leptospirelor a fost mai binecunoscută, precizîndu-se detaliile structurale cu microscopul electronic. Leptospira apare formată dintr-un cilindru protoplasmatic omogen, spiralat, care înconjură un filament axial rigid. Swain evidenţiază o membrană fină care înveleşte celula leptospirei, iar Babudieri observă o membrană fină şi la filamentul axial. După Moelbert şi Stanislavski filamentul axial are funcţii de schelet şi de mişcare. Simpson şi White (1961), Miller (1962) descriu detalii structurale şi în citoplasma leptospirelor secţionate.

La leptospirele normale nu s-au constatat granule şi sferule, cili sau flageli. Granulele observate în culturile vechi sînt considerate de unii cercetători (Bessemans, Woratz, Czekalowski) ca forme de rezistenţă, leptospirogene, iar de alţii (Kiktenko, Zimmermann, Herreweg) ca forme degenerative.

Leptospirele se colorează bine, cu soluţie Giemsa, în violet-roz, sau prin impregnare argentică (metoda Fontana-Tribondeau) în brun-negre. După fixare şi colorare, leptospirele pierd forma caracteristică, mai ales în produsele patologice, luînd aspectul boreliilor cu ondulaţii mari şi cîrligele desfăcute. Leptospirele spălate pot fi colorate cu orice soluţie apoasă din derivaţi ai anilinei.

Caractere de cultură. Leptospirele sînt cultivate în aerobioză, la un pH optim de 7,2—7,4, temperatură de 10—37° şi întuneric. Wolff a observat că temperatura optimă pentru cultivarea leptospirelor este de 30—32°. În ţara noastră cultivarea leptospirelor se face la temperatura de 28°. Viabilitatea leptospirelor dezvoltate în mediile de cultură se păstrează mai multe luni de zile la temperatura laboratorului şi întuneric.

Pentru prevenirea evaporării mediul este acoperit cu un strat de 0,5—1 cm de ulei de parafină sterilă.

Serul de iepure, introdus de Noguchi în mediile pentru cultivarea leptospirelor, nu a putut fi înlocuit cu vreun alt substituent organic. Dintre vitamine, tiamina şi vitamina B_{12} par să favorizeze dezvoltarea leptospirelor. Multiplicarea lor se face prin diviziune transversală (izotipie) care durează 5—60 de minute. După Kiktenko, procesul de multiplicare cuprinde 3 faze : faza latentă cu o durată de 1—2 zile, în care numărul leptospirelor se dublează ; faza logaritmică care durează 3—8 zile, în care leptospirele se divid activ, pentru ca în următoarele 6—12 zile multiplicarea să scadă şi faza de degenerescenţă, în care numărul leptospirelor diminuează, devin granulate şi cu mobilitate redusă.

Pe mediile semisolide şi solide, au fost descrise recent 5—6 tipuri de colonii devenite vizibile prin reacţia oxidazelor. Leptospirele se dezvoltă bine şi repede în embrionul de găină cînd sînt inoculate pe membrana corioalantoidă.

Caractere biochimice şi metabolice. Activitatea metabolică a fost puţin studiată. Zaharurile şi alcoolul sînt inconstant fermentate. Serul de iepure este singurul element care influenţează cel mai mult consumul de oxigen al leptospirelor.Vitamina B_1, fierul, hemoglobina, acidul oleic, sînt consideraţi factori de creştere. După Chang, factorul de creştere aflat în serul de iepure este distrus la 100°. Hidraţii de carbon şi peptona par să nu influenţeze metabolismul leptospirelor. În cultură, leptospirele produc hialuronidază, fosfolipaze, oxidaze şi catalaze. Elaborarea de coagulază şi fibrinolizină constatată de Zemskov (1962) nu a fost confirmată şi de alţi cercetători. Din *L. pomona* s-a izolat un factor hemolitic cu specificitate pentru globulele roşii de oaie cu o activitate maximă la 37° şi pH 7,4—8. Cox extrage din leptospirele saprofite un antigen sensibilizant al hematiilor de oaie cu specificitate de gen. Din leptospirele saprofite s-a izolat o hemolizină cu acţiune pe hematiile de şoarece, constituind un mijloc practic pentru diferențierea leptospirelor patogene de cele saprofite.

Deși leziunile histopatologice pledează pentru existența unui factor toxic, nu au fost evidențiate pînă acum exo- sau endotoxine la leptospirele patogene.

Rezistența la agenți fizici, chimici și biologici. Leptospirele rezistă în sol și apă în raport cu pH, temperatura și gradul de puritate. Nu suportă uscarea și nici pH ușor acide sau intens alcaline. Spre deosebire de leptospirele saprofite, cele patogene sînt repede distruse în mediul exterior. Experimental, s-a dovedit că *L. icterohaemorrhagiae* trăiește în apa de conductă sterilă timp de 4 săptămîni, în apa contaminată 2 săptămîni, în apele menajere 12–14 ore, iar în apa de mare 18–24 de ore. În mediile de cultură, supraviețuiesc în medie 2–4 luni, putînd atinge și 7 ani. În sîngele defibrinat, se mențin vii 7 zile, iar în ficatul de cobai se con-

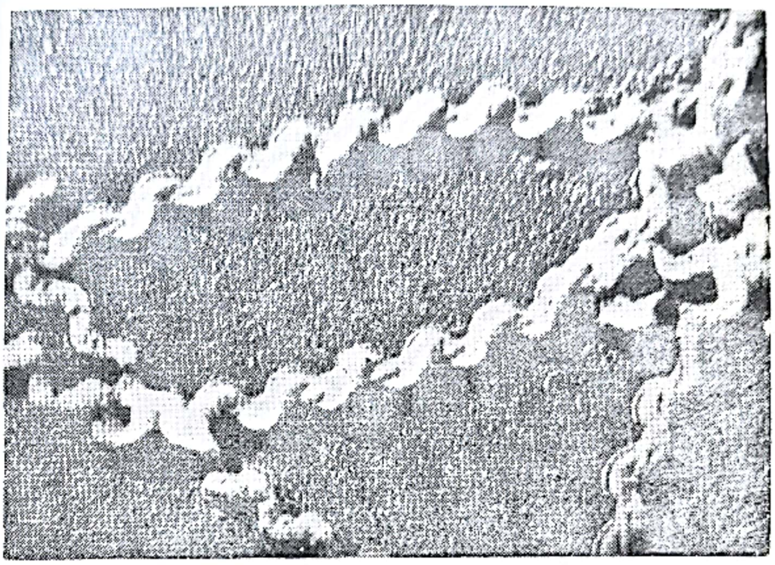


Fig. 144. — Leptospire examinate la microscopul electronic (× 40 000) (Scanga).

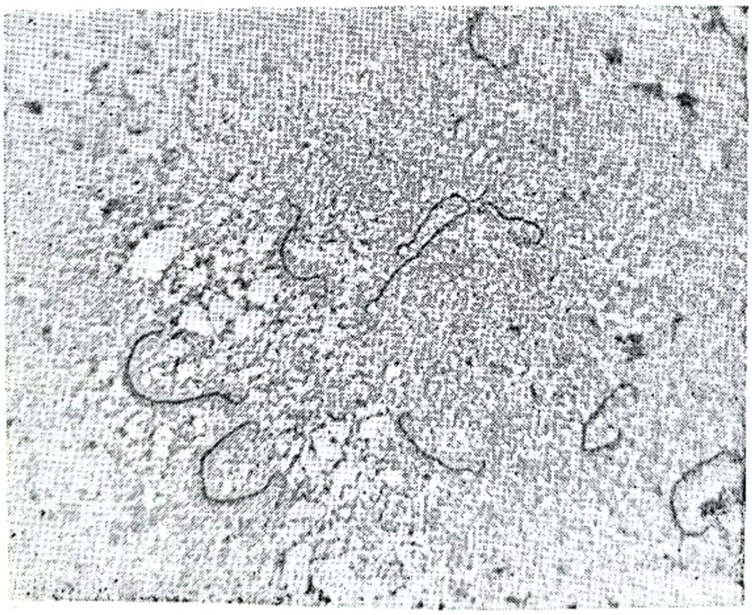


Fig. 145. — Cultură de leptospire, colorație Fontana-Tribondeau (× 900).

servă la 0° timp de 26 zile. În carnea animalelor bolnave rezistă 72 ore la 0°, în lapte 3 zile la 0°, iar în unt 20 de ore. Leptospirele mor instantaneu în urina acidă, bilă şi săruri biliare. Sucul gastric normal le distruge în 10—15 minute. Lumina solară şi razele ultraviolete le distrug în 2 ore. Leptospirele mor în 10—15 minute la temperatura de 60°. La temperaturi scăzute de —6° şi —35°, ca şi prin îngheţare-dezgheţare rapidă, se distrug numai o parte din leptospire. Sînt sensibile la acţiunea oligodinamică a metalelor (în special cupru). Dezinfectanţii obişnuiţi le omoară mai repede decît pe ceilalţi germeni. Leptospirele sînt lizate de penicilină, sînt inhibate de aureomicină, teramicină şi streptomicină şi nu par influenţate în dezvoltarea lor de cloromicetină şi sulfamide.

Structura antigenică. A putut fi cunoscută graţie cercetărilor efectuate de Hiath, Schneider, Rothstein şi Hiath etc. asupra constituţiei chimice şi antigenice la leptospirele patogene.

În structura antigenică a leptospirelor patogene existenţa a două fracţiuni antigenice a fost definitiv confirmată :

— Antigen de suprafaţă (antigen P) specific de tip, activ în reacţiile de precipitare, aglutinare şi fixare a complementului şi care din punct de vedere chimic este format dintr-un polizaharid cuplat cu o proteină.

— Antigen somatic (antigen S) specific de specie şi gen, obţinut prin dezintegrarea leptospirelor, activ în reacţiile de precipitare şi fixare a complementului şi care din punct de vedere chimic este un lipopolizaharid.

Extractele alcoolice obţinute de Carlinfanti, folosite în reacţiile de fixare a complementului ca şi cele obţinute de Cox, utilizate în reacţiile de hemoliză a hematiilor sensibilizate, par a fi identice cu antigenul somatic specific de specie şi gen.

Caractere de patogenitate. Din punctul de vedere al patogenităţii, leptospirele se împart în două categorii : saprofite şi patogene. Leptospirele patogene trecute în serie pe mediile de cultură îşi pierd virulenţa, care uneori se recîştigă prin treceri repetate pe cobai. Există deosebiri de virulenţă la aceeaşi tulpină, chiar în raport cu calea de eliminare : leptospirele eliminate prin urină sînt mai puţin virulente decît cele din sînge. Leptospirele din grupul *icterohemorrhagiae* sînt cele mai virulente, iar leptospirele din grupul *grippotyphosa* sînt cele mai puţin patogene Între aceste două grupe se situează din punctul de vedere al patogenităţii *L. canicola pomona* etc.

Toţi cercetătorii sînt de acord că patogenitatea leptospirelor este determinată de virulenţă, dar pînă în prezent nu se cunoaşte nici un factor de virulenţă.

În ultimul timp se observă tendinţa de a explica efectele biologice ale leptospirelor patogene şi prin intervenţia factorilor toxici.

Ipoteza legăturii dintre hemolizină, ca atribut al unei exotoxine, şi patogenitatea leptospirelor a fost emisă pentru prima oară de Alexander şi col., Russel, în 1956 cînd pun în evidenţă la *Leptospira pomona* un factor hemolitic activ faţă de hematiile de oaie. Cercetările privind rolul hemolizinei în patogenia leptospirozelor făcute de Kemenes (1958) pe oi şi vite, de Dosza, Kemenes, Szent-Ivany (1960), de Bauer şi col. (1961) pe miei, vin în sprijinul acestei ipoteze. Cu toate acestea studiile sînt insuficiente pentru a trage concluzia că hemolizina leptospirelor constituie un factor toxic.

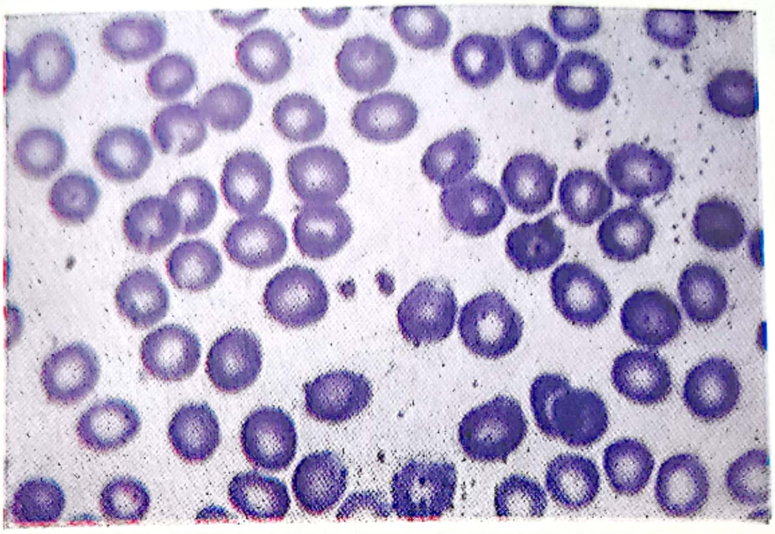


Fig. 146. — Leptospire în frotiu sanguin — coloraţie Giemsa (× 900).

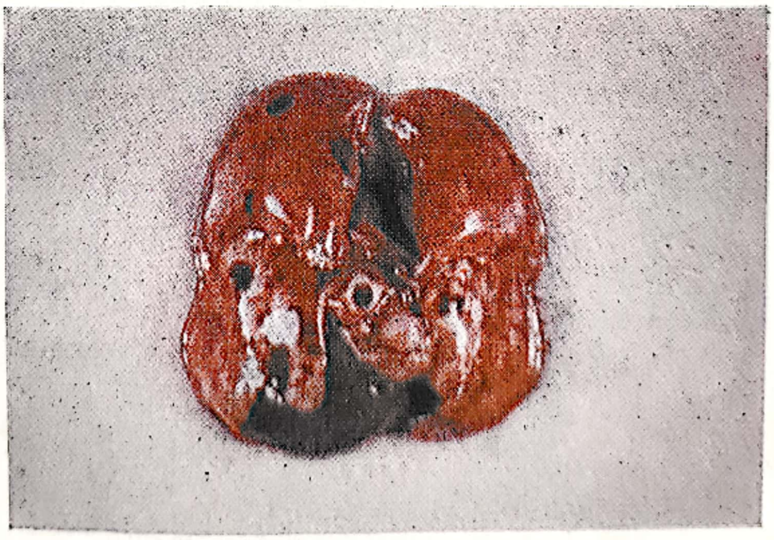


Fig. 147. — Leziuni tipice hemoragice în plămîn de cobai infectat cu leptospire patogene.

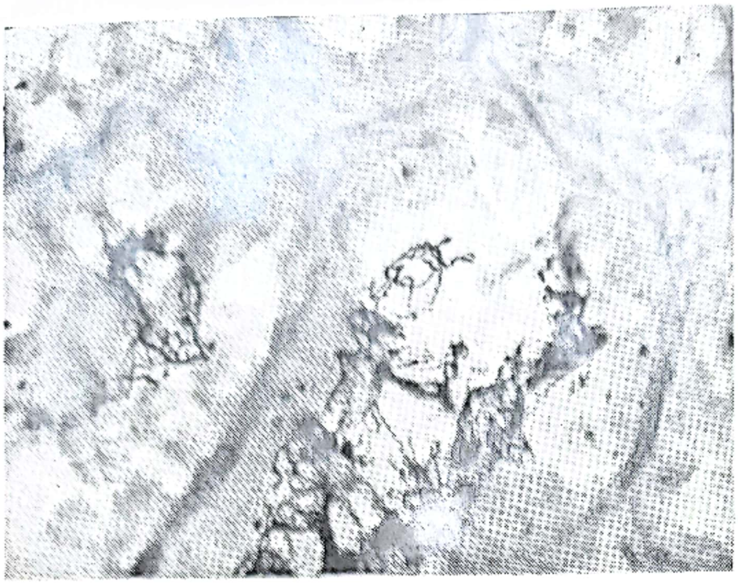


Fig. 148. — Cuib de leptospire în corticala renală de arici (metoda Manuelian).

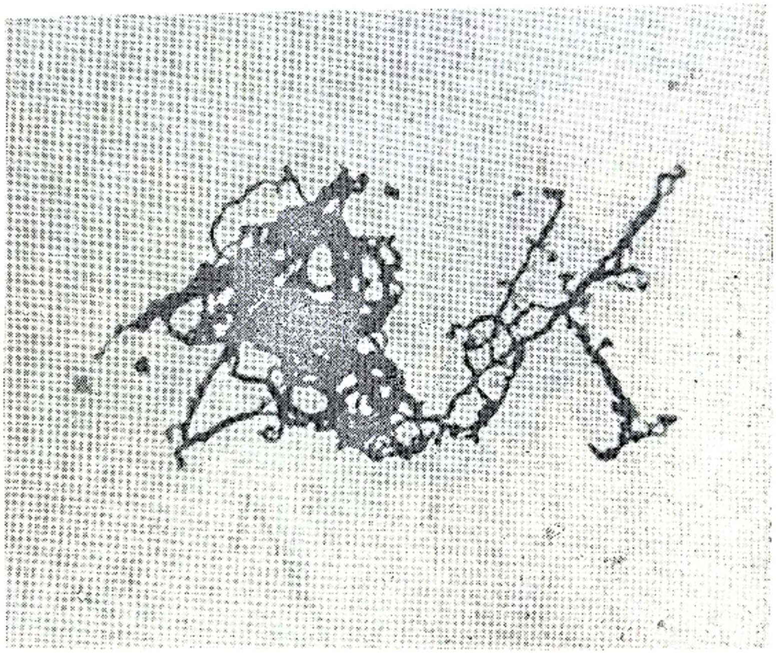


Fig. 149. — Leptospire aglutinate și în proces de liză: colorație Fontana-Tribondeau (× 900).

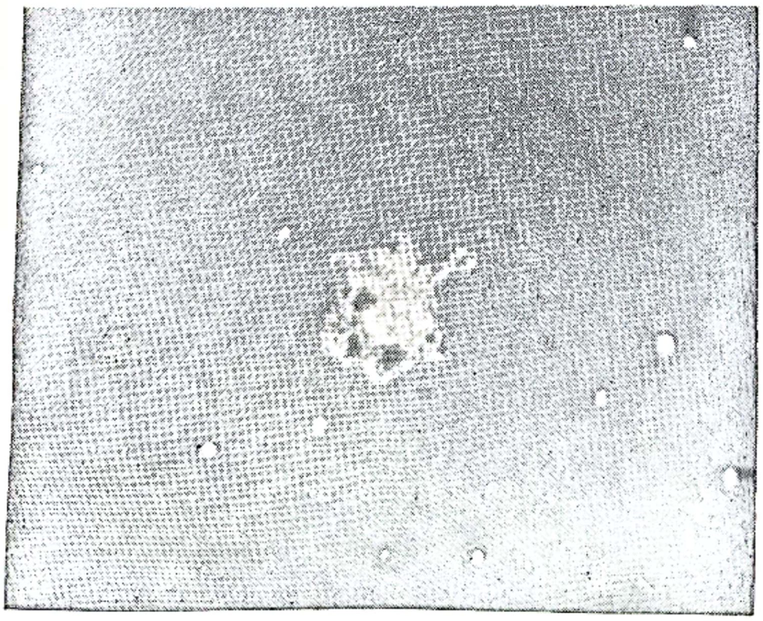


Fig. 150. — Leptospire aglutinate și lizate de ser imun (examen pe fond întunecat; × 450).

După van Riel, hemolizinele prin stabilitatea prezenţei la anumite tulpini de leptospire, ar constitui mai curînd un element de diferenţiere biologică în cadrul serogrupului. Kmety şi Bakoss (1961) cercetînd atît lipazele cît şi hemolizinele în culturile de leptospire constată că prezenţa acestor două enzime n-are nici o legătură cu virulenţa.

Sînt o serie de observaţii care sugerează că în activitatea leptospirelor patogene intervine o componentă toxică legată de constituţia chimică a celulei (endotoxină): modificările histopatologice, ineficienţa tratamentului cu antibiotice şi ser imun în fazele tardive de boală, asemănarea alterărilor provocate de endotoxinele purificate ale bacteriilor Gram-negative cu cele produse de leptospirele patogene, absenţa leptospirelor în organele animalelor (sau omului) decedate de leptospiroză etc. Pe această linie de cercetare se situează lucrările vechi ale lui Fukushima şi Hosoya (1926) şi Higuschi (1931) ca şi lucrările recente ale lui Imamura (1957) şi Gourley şi Low (1962). Totuşi în prezent nu avem destule probe evidente cu privire la existenţa, natura chimică şi rolul endotoxinei în patogenitatea leptospirelor.

Boala spontană la om şi animale. Rozătoarele fac o boală uşoară, avînd un rol important în menţinerea leptospirelor în natură. Animalele domestice (porci, cîini, cai, vite etc.) fac o formă morbidă mai gravă sau mai uşoară, manifestată prin febră, diaree, icter. După vindecarea clinică, rămîn purtătoare de leptospire ani de zile.

Din punct de vedere clinic, leptospirozele umane erau împărţite în icterice grave, cauzate de *L. icterohemorrhagiae*, *L. bataviae* şi forme anicterice benigne, provocate de *L. pomona*, *L. grippotyphosa*, *L. sejroe* etc. Experienţa acumulată în ultimii ani demonstrează că orice tip serologic de leptospira poate provoca leptospiroza în forme clinice foarte variate, de la formele inaparente la tablourile clinice grave icterohemoragice. În formele benigne predomină febra şi meningita, în formele medii şi grave se adaugă leziunile renale, hepatice şi hemoragiile. Moartea survine prin uremie consecutivă leziunilor renale. Printre complicaţii întîlnim mai frecvent leziuni oculare (irite, iridociclite etc.).

Infecţia experimentală. Animalele receptive la infecţia cu leptospire sînt: cobaii mici (pînă la 200 g), hamsterii şi iepurii tineri (pînă la 500 g). Boala experimentală pe cobai a făcut posibilă cunoaşterea patogeniei infecţiei umane. În perioada de incubaţie, care durează în medie 8—12 zile, leptospirele pătrund prin pielea cu excoriaţii sau mucoasele macro-organismului, trec pe cale sanguină spre ficat şi splină, unde se multiplică ca într-un adevărat mediu de cultură. Spre sfîrşitul fazei de incubaţie, leptospirele invadează sîngele, corespunzînd stadiului septicemic care durează în medie 3—7 zile. După a 7-a zi de la debut, concomitent cu apariţia anticorpilor specifici în sînge, leptospirele dispar din circulaţie, localizîndu-se în rinichi, de unde se elimină prin urină, timp de 30—40 de zile.

Imunitate. Leptospirele produc în umori anticorpi specifici: lizine, aglutinine, anticorpi fixatori etc. Liza specifică a leptospirelor este deosebită de cea a bacteriilor, efectuîndu-se în absenţa alexinei şi condiţionată de prezenţa electroliţilor în mediu apos. Anticorpii apar în a 5-a — a 8-a zi de la îmbolnăvire, ating un titru maxim în săptămîna a 3-a — a

4-a și se mențin la un titru scăzut ani de zile. Imunitatea în leptospiroză este specifică de tip. Unele animale, broasca și peștii, au o imunitate naturală, explicată prin fenomenele de fagocitoză mai active.

Tratament specific. Penicilina, aureomicina și teramicina administrate în primele zile de boală s-au dovedit eficace în terapia leptospirozelor. În formele grave se poate asocia și seroterapia specifică.

Diagnostic de laborator

Ținînd seama de patogenia bolii, vom examina în prima săptămînă de boală : sîngele și lichidul cefalorahidian (eventual *post mortem*, organe : ficatul, rinichiul) pentru evidențierea leptospirelor, iar în a doua săptămînă, sîngele și uneori lichidul cefalorahidian pentru determinarea anticorpilor specifici și urina pentru izolarea leptospirelor.

I. **Examene directe** : se folosesc următoarele examene :

1. *Examenul microscopic pe fond întunecat.* Cu această metodă pot fi examinate în preparate proaspete, între lamă și lamelă : sîngele bolnavului, urina, lichidul cefalorahidian, organele (ficat, rinichi, umane sau animale, recoltate în primele ore de la deces) și apa.

Sîngele este recoltat în primele 6 zile de la debutul bolii (perioada leptospiremică) în soluție de oxalat de potasiu 1%, în proporție de 5 ml sînge la 0,5 ml soluție oxalat de potasiu. Sîngele astfel obținut este lăsat la temperatura camerei sau la 25 — 30° pentru sedimentarea hematiilor. Din lichidul supernatant, se depun pe o lamă cîteva picături cu ajutorul ansei sau pipetei Pasteur și se examinează sub lamelă la microscopul cu fond întunecat (obiectiv nr. 20 sau 40, ocular 10 sau 15). Lamele folosite nu trebuie să depășească grosimea de 1 mm, trebuie să fie curate și fără zgîrieturi. În locul uleiului de cedru, se poate folosi între condensator și lamă glicerina, care are avantajul că e mai ușor de procurat, nu se usucă și se poate curăța ușor. Leptospirele apar subțiri, strălucitoare, foarte mobile și cu spire regulate pe toată lungimea corpului. În afara deplasării în cîmp, o mișcare caracteristică a leptospirelor este răsucirea în jurul axului lor longitudinal. Densitatea lor este variabilă, între 1 și 3 pe cîmp, pînă la o singură leptospiră în două sau trei picături examinate.

Urina se recoltează în a 8-a zi de boală, după o prealabilă administrare de bicarbonat de sodiu pentru alcalinizarea urinii. O cantitate de 50 — — 100 ml urină proaspăt recoltată este centrifugată timp de 1 — 2 ore la 3 000 t/min. Se examinează sedimentul urinar în preparat proaspăt, între lamă și lamelă.

Organele (ficat, rinichi) sînt recoltate de la cadavru în mod steril și depuse în cutii Petri sau mojare sterile, unde sînt fragmentate. Apoi sînt triturate și emulsionate în ser fiziologic, în proporție de aproximativ 3 ml ser fiziologic la 2 g organ. Suspensia obținută este trecută într-un tub steril. După 30 — 60 de minute, se examinează lichidul supernatant în același mod ca și sîngele. Se va ține seama că deseori în picăturile care conțin hematii apar formațiuni de tipul pseudospirochetelor, care pentru un ochi neexperimentat pot fi luate drept leptospire. Pseudospirochetele au adesea dimensiunea unei leptospire cu capetele îngroșate, care simulează croșetele leptospirelor și o mișcare pasivă, fără a se deplasa în cîmp. Nu au spire și de multe ori un capăt este prins de hematii.

2. *Examenul frotiurilor colorate.* Se fac frotiuri din sîngele bolnavului (perioada septicemică), din urină, lichidul cefalorahidian și organe. Colorațiile care dau rezultate bune sînt : colorația Giemsa și impregnarea argentică după metoda Fontana-Tribondeau.

a) Colorația Giemsa. Frotiurile din sînge, urină, lichid cefalorahidian, amprente din organe, după uscare, sînt introduse în baie cu soluție Giemsa (2 picături la 1 ml apă), la temperatura de 37°. După 30 de minute se spală lama cu grijă la un curent de apă și se repetă colorarea cu soluție Giemsa proaspăt preparată. Frotiurile se scot după 30 de minute, se spală, se usucă și se examinează cu imersia. Leptospirele apar colorate în violet-roșcat. La unele leptospire se recunosc perfect spirele regulate și capetele îndoite. Dimensiunile lor întrec, de cele mai multe ori, dublul sau triplul hematiei.

b) Impregnarea argentică după metoda Fontana-Tribondeau. Tehnica este descrisă la genul *Treponema*. Leptospirele apar mai îngroșate, colorate în negru pe fond galben. Metoda este recomandată pentru frotiurile care nu au sau sînt sărace în hematii.

3. *Cercetarea leptospirelor în secțiuni de organe.* Leptospirele apar colorate în maro-brun, iar țesutul în galben (cînd se folosește tehnica de impregnare argentică după metoda Manuelian, descrisă la genul *Treponema*).

II. **Izolarea leptospirelor.** Pentru izolarea leptospirelor se folosesc însămînțările și inoculările la animalele receptive.

1. *Însămînțări.* Mediile uzuale pentru leptospire :

a) *Mediul Uhlenhuth.* Este preparat cu apă de robinet sterilă, la care se adaugă ser inactivat de iepure (5 – 10%).

b) *Mediul Terskih.* Este format din apă bidistilată, tamponată cu soluție Sörensen la pH 7,2 – 7,4 și ser inactivat de iepure, în proporție de 5 – 10%.

c) *Mediul Korthof.* Are cea mai largă utilizare în izolarea și cultivarea leptospirelor. În 2000 ml apă bidistilată se dizolvă următoarele ingrediente : peptonă Witte 1,6 g, clorură de sodiu 2,8 g, bicarbonat de sodiu 0,04 g, clorură de potasiu 0,08 g, clorură de calciu 0,08 g, fosfat monopotasic 0,36 g, fosfat bisodic 1,92 g. După dizolvare se filtrează prin hîrtie de filtru și se sterilizează timp de 30 de minute la presiunea de o atmosferă. Se filtrează din nou, după răcire. Se ajustează pH la 7,2 – 7,4. Se resterilizează timp de 30 de minute la presiunea de o jumătate de atmosferă. După răcire, se adaugă ser inactivat de iepure, în proporție de 5 – 10%. Se tindalizează o oră la 60°, timp de 3 zile consecutiv. Se repartizează în tuburi de hemoliză cîte 3 – 5 ml. Se controlează sterilitatea, lăsîndu-le la temperatura de 37°, timp de 48 de ore. Pentru cultivarea leptospirelor se folosesc numai mediile care rămîn limpezi. Mediul dă rezultate bune și în lipsa clorurii de calciu și a peptonei.

Produsele patologice care se însămînțează : sîngele obținut în primele 6 zile de boală, urina recoltată după a 6-a zi de boală, lichidul cefalorahidian de la bolnavii cu reacții meningiene, fragmente de organe ale animalelor în experiență sau de la cadavrele umane. Produsele patologice trebuie însămînțate în cel mai scurt timp de la recoltare, deoarece după 2 – 4 ore leptospirele se lizează. Sîngele se recoltează cu sau fără soluție de citrat de sodiu sau oxalat de potasiu ; 4 – 6 tuburi cu medii se însămînțează cu cantităţi crescînde de sînge, începînd de la o picătură în primul tub. Urina şi lichidul cefalorahidian sînt însămînţate fie ca atare, fie numai sedimentul obţinut prin centrifugare şi reluat în ser fiziologic steril.

Urmărirea însămînţărilor. Jumătate din mediile însămînţate sînt incubate la 28°, iar restul la 37°. Se controlează prezenţa leptospirelor din 5 în 5 zile, timp de 60 de zile, la microscopul cu fond obscur prin picături puse pe lamă. Dacă s-au dezvoltat leptospire, se fac subculturi pe medii proaspete.

Inocularea animalelor (testul biologic).

Animalele receptive sînt : cobaii de 100 — 200 g, hamsterii aurii şi iepurii pînă la 500 g. Se aleg numai animalele normale, anterior termometrate.

Produsele patologice care se inoculează la animalele sensibile sînt aceleaşi ca şi cele folosite pentru însămînţări pe mediile de cultură. Inoculările se fac intraperitoneal, în cantitate de 10 ml la iepure, 5 ml la cobai şi 1 ml la şoarece. Pentru izolarea leptospirelor patogene din apă se foloseşte cu rezultate bune următorul procedeu : apa recoltată se pune într-un cristalizor ; un cobai de 120 — 150 g este epilat şi i se scarifică uşor pielea abdomenului. Se introduce cobaiul în apa de cercetat, astfel ca regiunea scarificată să fie complet acoperită de apă şi se menţine 2 — 4 ore. După 10 — 20 — 30 — 60 de minute de la scoaterea animalului din apă, se fac puncţii cardiace şi hemoculturi pe mediul Korthof. Mai frecvent este folosită metoda perfuziei, modificată de van Thiel. Prin două butoniere făcute în pielea abdomenului la cobai se trece o cantitate de 3 —5 litri apă de cercetat, încălzită la 37°. Cobaii perfuzaţi sînt puncţionaţi în inimă pentru hemoculturi, apoi sînt urmăriţi ca şi animalele inoculate.

Urmărirea animalelor inoculate. Cobaii sînt termometrizaţi zilnic, dimineaţa şi seara. În prima zi de febră (temperatura normală a cobaiului oscilează între 38° şi 39°,5) se recoltează sînge din inimă şi se fac hemoculturi şi examene directe.

Dacă în produsul inoculat se aflau leptospire foarte virulente, după o incubaţie de 2 — 5 zile cobaiul face febră şi moare în hipotermie în a 4-a — a 9-a zi de la inoculare. Animalul mort sau sacrificat prezintă la autopsie icter şi hemoragii subcutanate şi în viscere. Ficatul şi rinichii sînt măriţi de volum, hemoragici şi friabili. Plămînul prezintă pete hemoragice înconjurate de un halou congestiv. La examenul microscopic pe fond obscur se găsesc numeroase leptospire în sînge, ficat, plămîn etc.

Cobaii inoculaţi cu leptospire slab patogene fac, după o incubaţie de 7 — 12 zile, o boală febrilă, manifestată printr-unul sau mai multe puseuri febrile de 40 — 41° şi cu pierdere în greutate.

Pentru că de obicei se vindecă spontan, cobaii sînt sacrificaţi în a 21-a zi de la inoculare. La autopsie prezintă, de cele mai multe ori leziunile tipice pulmonare şi rareori leziuni hemoragice în ficat şi rinichi. La examenul direct se găsesc numeroase leptospire în corticala rinichiului.

Pentru izolarea leptospirelor se fac însămînţări din organe (fragmente de ficat şi rinichi), sînge şi urină. Manipularea animalelor infectate experimental se va face numai cu mănuşi de cauciuc ; termometrele vor fi şterse cu un tampon de vată muiată în soluţie de sublimat 1‰, după termometrizarea fiecărui animal ; în timpul autopsiei se vor folosi ochelari de protecţie; tăvile în care se autopsiază animalele, mesele de lucru se şterg cu una din soluţiile acide: acid sulfuric 5%, acid acetic 1%, acid clorhidric 1‰ etc.; borcanele de sticlă în care s-au ţinut animalele infectate se dezinfectează cu soluţie de acid sulfuric 5%; animalele în experienţă vor fi ţinute în camere speciale; animalele autopsiate vor fi incinerate.

Identificarea leptospirelor izolate se face folosind metodele:

a) reacţia de aglutinare-liză încrucişată;

b) proba absorbţiei prin saturarea anticorpilor;

c) testul de imunitate încrucişată.

III. Reacţiile serologice.

Reacţia de aglutinare-liză. Antigene: colecţia de tulpini de leptospire se întreţine prin treceri repetate la 20 — 30 de zile pe mediile folosite pentru cultivarea leptospirelor. Fiecare tulpină de leptospire este însămînţată în cîte 5 — 6 tuburi cu mediu. Tulpinile pentru aglutinare se trec la 7 zile. Ca antigene se folosesc culturile vii de leptospire, în vîrstă de 6 — 12 zile, cu o densitate de 500—1 000 elemente pe cîmp (obiectiv nr. 20, ocular nr. 15). Tulpinile care cresc prea abundent sînt însămînţate pe medii cu 1% ser de iepure. Înainte de a efectua reacţia de aglutinare-liză, antigenele sînt controlate la microscopul cu fond întunecat pentru omogenitate, aglutinare spontană şi aglutinabilitate specifică, cu serurile test.

Prepararea serurilor test. Se alege o cultură bogată de leptospire, în vîrstă de 10 zile, care este încălzită timp de 60 minute la 60°. Se imunizează un iepure normal, inoculîndu-i cîte 2 ml cultură omorîtă în vena marginală a urechii, de 3 ori la interval de 6 zile. După 6 zile de la ultima inoculare, se sîngerează iepurele pentru aglutinarea de probă. Dacă titrul serului trece de 25 000, iepurele este sîngerat „à blanc”, din carotidă. Dacă titrul nu este satisfăcător, se face o nouă inoculare. Serul decantat este fiolat şi se notează pe eticheta fiolei tipul anticorpilor, titrul maxim şi data obţinerii serului. Se păstrează la +4°.

Material de cercetat. Anticorpii se cercetează de obicei în serul sanguin şi mai rar în lichidul cefalorahidian şi urină. Aglutininele şi lizinele apar în sîngele bolnavului din a 8-a zi de boală, atingînd un titru maxim în săptămîna a 3-a — a 4-a, scăzînd apoi treptat şi menţinîndu-se la titru mic, ani de zile. Serurile pot fi folosite proaspete sau inactivate. Ele trebuie să fie limpezi şi să nu conţină hematii în suspensie. Serurile lacate nu sînt utilizabile.

Tehnica reacţiei de aglutinare-liză se poate efectua în două feluri:

Metoda rapidă de aglutinare pe lamă. Din serul bolnavului se face o diluţie iniţială de 1/50 în ser fiziologic. Se depun pe lamă atîtea picături cîte tulpini de leptospire se folosesc în reacţie. Se notează pe lamă, în dreptul picăturilor, antigenul care a fost pus în contact cu serul diluat al bolnavului. Pe cît posibil, picăturile de ser şi antigen trebuie să fie egale şi cît mai bine omogenizate. Prin adăugarea antigenului, diluţia serului se dublează. Contactul dintre ser şi antigen trebuie să se facă timp de 15 — 20 de minute. Lamele sînt lăsate pe masa de lucru, sub capac Petri şi atmosferă umedă, ferite de razele solare. Reacţia se citeşte la microscopul cu fond întunecat. Se continuă reacţia cu diluţii de ser, cu tulpinile de leptospire la care s-a observat fenomenul de aglutinare sau liză.

Aglutinarea se manifestă prin îngrămădirea leptospirelor în gheme strînse mici (aglutinare intensă unde intervine și liza) sau gheme stelate cu aspect de păianjen, mobile, datorite extremităților libere ale leptospirelor. Liza începe prin umflarea, imobilizarea, ștergerea contururilor, dînd un aspect granular leptospirelor, putînd să ducă la dezagregarea și chiar dispariția lor. Aceste două fenomene, liza și aglutinarea pot apărea concomitent sau izolat. În diluții strînse putem avea numai liză, în diluții mari numai aglutinare. Notarea lizei se face cu litera „L", iar aglutinarea cu: + = 4 – 5 gheme; ++ = de la 6 gheme în sus și leptospire libere și +++ = aglutinare totală a leptospirelor. Considerăm un ser pozitiv, cînd titrul este mai mare de 1/200.

În 10 – 20% din cazuri nu putem preciza tipul de leptospire care a provocat îmbolnăvirea datorită coaglutininelor care întrec în titru anticorpii specifici de tip, în primele 2 – 3 săptămîni de boală (reacții paradoxale). Se recomandă, în general, urmărirea în dinamică a titrului anticorpilor în serurile bolnavilor și după a 20-a zi de la debut, cînd de obicei diminuează titrul anticorpilor nespecifici. Anticorpii decelați în titruri mici și care nu cresc în diferitele faze ale bolii pot fi interpretați ca anticorpi reziduali, anamnestici sau anticorpi provocați de tipuri de leptospire pe care nu le avem în lotul antigenelor folosite în reacția de aglutinare-liză. Rareori, există seruri care nu conțin anticorpi, deși aparțin unor îmbolnăviri sigure de leptospiroză, diagnosticate prin izolarea agentului patogen.

Metoda de aglutinare în tuburi. Nu se mai practică în țara noastră. Se recomandă aglutinarea pe lamă, întrucît dă rezultate echivalente aglutinării în tuburi, prezentînd avantajul unei metode rapide de diagnostic cu economie de material.

Reacția de fixare a complementului (RFC). Au fost folosite numeroase antigene specifice de tip sau grup, formolate sau uscate. Numărul mare de antigene care trebuie folosite în reacție au făcut-o nepractică. Recent, Sturdza și Elian au introdus în RFC (tehnica este descrisă la diagnosticul serologic al rickettsiozelor) un antigen polivalent, preparat din tulpina *L. biflexa Patoc*, cu rezultate bune în diagnosticul leptospirozelor umane, frecvente în țara noastră. Reacțiile pozitive obținute în diagnosticul serologic al leptospirozelor cu antigen din *L. biflexa Patoc* sînt explicate prin existența unei fracțiuni antigenice comune de gen care pare să fie identică cu antigenul somatic de natură lipopolizaharidică.

Observații asemănătoare au fost făcute cu cîțiva ani înainte, și la treponeme. Stabilirea tipului de leptospire care a cauzat îmbolnăvirea se completează prin reacția de aglutinare-liză sau izolarea tulpinii. Anticorpii fixatori apar mai precoce și se mențin puțin timp de la vindecare. RFC are o valoare practică de diagnostic precoce și de diagnostic diferențial între boala recentă și cea anterioară.

Epidemiologie

Leptospirozele sînt răspîndite pe tot globul, fiind legate de prezența leptospirelor la numeroasele specii animale care constituie rezervorul natural și izvorul de infecție. Din cele peste 80 de tulpini diferite de leptospire patogene pentru om, cunoscute pînă în prezent, în Europa se întîlnesc

13 tipuri, şi anume : *L. IH*, *L. canicola*, *L. sejroe*, *L. bataviae*, *L. pomona*, *L. australis A*, *L. poi*, *L. sachsköbing*, *L. grippotyphosa*, *L. mitis*, *L. ballum*, *L. australis B*. Cercetările făcute de Combiescu, Sturdza şi col. au stabilit prezenţa următoarelor serotipuri de leptospire patogene în ţara noastră : *L. pomona*, *L. IH*, *L. canicola*, *L. sejroe*, *L. grippotyphosa*, *L. mitis*, *L. bataviae*, *L. hebdomadis*, *L. australis A.*, *L. poi*, *L. sachsköbing şi L. ballum*. Cîinii, porcii, vitele, caprele, oile, şobolanii albi, şobolanii cenuşii, pisicile, aricii, broaştele ţestoase de apă etc. au prezentat, în procente variate, anticorpi pentru diversele tipuri de leptospire. În afara cîinilor, care sînt în special infectaţi cu *L. canicola*, la celelalte animale a predominat infecţia cu *L. pomona*. Rozătoarele au rol de rezervor primar şi izvor de infecţie. Cercetările făcute printre animalele domestice au scos în evidenţă importanţa lor ca rezervor secundar în epidemiologia leptospirozelor.

Modul de transmitere este direct, prin contacul nemijlocit cu animale bolnave sau purtătoare , sau indirect, prin intermediul alimentelor infectate (în cazuri sporadice) şi prin intermediul apei (în epidemii hidrice). După cercetătorii sovietici, unele artropode ar avea un rol de vector în epizootologie.

Leptospiroza pomona (boala tinerilor porcari). *Leptospira pomona* a fost izolată de Klyton, Derrick şi Cilento în 1937, în localitatea Pomona din Australia. Babudieri şi Bianchi (1938 — 1941) în Italia şi Gsell (1941 — 1944) în Elveţia au arătat că boala tinerilor porcari, socotită multă vreme o viroză, este cauzată de *L. pomona.*

Din punct de vedere clinic, predomină formele benigne, cu debut meningian, deseori confundate cu meningitele limfocitare benigne. Majoritatea îmbolnăvirilor au apărut printre agricultori (72,76 %), îngrijitorii de porci şi măcelari, în lunile calde ale anului.

Rezervorul animal îl constituie porcul. *Leptospira pomona* a fost izolată şi de la şobolani (*Rattus norvegicus*) în condiţiile infectării secundare în abatoare, prin consumarea cărnii animalelor bolnave (D. Combiescu, N. Sturdza). Infecţii cu *L. pomona* au fost depistate la vite, capre, oi, cai şi la şoareci de cîmp.

Leptospiroza hyos. Leptospira hyos a fost izolată de Johnson (1942) de la om şi de Savino şi Renella (1944) de la porc şi om. Rezervorul natural îl constituie porcul. În ţara noastră s-a izolat *L. mitis* de la porc şi de la omul bolnav.

Leptospiroza icterohaemorrhagiae (boala Weil şi Vasiliev). *Leptospira icterohaemorrhagiae* a fost izolată de Inada şi col. în 1914 de la omul bolnav. Cunoscută de multă vreme sub numele de boala Weil şi Vasiliev, leptospiroza IH este răspîndită pretutindeni cu o frecvenţă variabilă de la ţară la ţară. Multe îmbolnăviri au rămas nedepistate, întrucît se cunoştea numai tabloul clasic de boală. Profesiunile mai des atinse sînt : pescarii, agricultorii, laboranţii, medicii. Rezervorul îl constituie şobolanul (*Rattus norvegicus*). Şobolanii fac o boală inaparentă, leptospirele rămînînd cantonate în tubii contorţi ai rinichilor, de unde sînt eliminate prin urină, animalele devenind purtătoare permanente. Transmiterea leptospirelor de la un şobolan la altul se face prin intermediul apei, alimentelor, cadavrelor. De la şobolanii sălbatici se pot contamina şobolanii albi de laborator, cîinii, porcii, vitele, caii, care transmit cu mai multă uşurinţă boala la om.

Leptospiroza canicola (boala cîinilor din Stuttgart). *Leptospira canicola* a fost izolată în 1932 de Clarenbeck și Schüffner de la cîini. Boala la om este des întîlnită în Danemarca, Olanda și Anglia. După Gsell, pînă în 1950 au fost înregistrate 500 de cazuri pe tot globul, îmbrăcînd forma sporadică și mai rar forma micilor epidemii. Boala atinge toate vîrstele, iar femeile dau un procent mai ridicat de îmbolnăviri. Leptospiroza cu *L. canicola*, deși considerată benignă, poate provoca și decese. Rezervorul de infecție îl constituie cîinii : în Germania cîinii sînt infectați în proporție de 43%, în Italia în 36% și în R.P.R. în 31,41%.

Leptospiroza grippotyphosa (febra de mîl sau de apă). Agentul patogen a fost izolat de Tarasov în 1928. Acest serotip pare să fie cel mai răspîndit în Europa, provocînd epidemii masive în verile ploioase. În țara noastră, leptospiroza cu *L. grippotyphosa* a avut un caracter sporadic și în decurs de 5 ani au fost depistate numai 26 cazuri. Rezervorul natural îl constituie șoarecii de cîmp și de pădure.

Leptospiroza sejroe. Borg Petersen izolează *L. sejroe* de la *Mus spicilegus* (Danemarca). Ulterior a fost întîlnit acest tip serologic și la alte specii de rozătoare. În țara noastră, au fost diagnosticate 50 de cazuri în anii 1950—1955. S-au găsit anticorpi pentru *L. sejroe* în serurile de pisici, vite, cai și porci.

Leptospiroza bataviae (boala Weil indoneziană). *Leptospira bataviae* a fost izolată în 1926 de către Walch de la un bolnav care prezenta un tablou clinic de boală Weil. Rezervorul de leptospire îl constituie *Rattus norvegicus* (Indonezia) și *Micromis minutus soricinus* (Italia). La noi în țară, au fost diagnosticate serologic îmbolnăviri date de *L. bataviae*. Boala este răspîndită în Asia de sud-est, Danemarca, Italia, Bulgaria, Congo central etc. Anticorpii pentru *L. bataviae* s-au găsit și în serul cîinilor, vitelor, pisicilor, cailor etc.

Leptospiroza hebdomadis (febra de 7 zile). *Leptospira hebdomadis* a fost izolată în 1918 de Ido, Ito și Wani de la un bolnav cu febră de 7 zile. Sursa de infecție o constituie *Microtus montebelli*. Au fost semnalate îmbolnăviri date de *L. hebdomadis* în Japonia, Indonezia, Europa. În țara noastră, numărul îmbolnăvirilor depistate serologic este foarte mic.

Profilaxia leptospirozelor

Profilaxia nespecifică în leptospiroze se adresează rezervorului de virus, căii de transmitere și porții de intrare.

Profilaxia specifică se face prin seruri imune, vaccinuri și antibiotice. Serurile pot fi monovalente sau polivalente și se utilizează în scop profilactic în epizootologie. Vaccinurile se obțin din culturi de leptospire, omorîte prin căldură sau substanțe chimice. Vaccinarea anumitor grupe profesionale a fost folosită cu succes în profilaxia leptospirozelor în U.R.S.S. Polonia, Japonia, Italia. La noi, sero- și vaccinoprofilaxia sînt folosite numai în medicina veterinară. În scop profilactic, în cazurile de infectare sigură (infecții de laborator) se recomandă penicilina, administrată precoce.

Genul Treponema

Numele de „Treponema” vine de la aspectul de fir răsucit (*trepo* = răsucire, *nema* = fire).

În acest gen sînt grupate spirochetele de 3 — 18 μ lungime, cu spire mai mari și mai puține.

Unele specii se colorează numai cu soluţia Giemsa şi nitrat de argint. În preparatele proaspete se văd la microscopul cu cîmp întunecat. Se cultivă în condiţii de strictă anaerobioză.

Treponemele patogene pentru om şi animale produc în general leziuni tisulare.

Clasificarea treponemelor

A. *Treponeme ale omului*:
- 1. *Patogene*
  - a) *Tr pallidum* agentul etiologic al sifilisului
  - b) *Tr. pertenue* agentul etiologic al pianului
  - c) *Tr. carateum* agentul etiologic al pintei
- 2. *Saprofite*
  - a) *Tr. calligyrum*
  - b) *Tr. genitalis*
  - c) *Tr. mucosum*
  - d) *Tr. microdentium*

B. *Treponeme ale iepurelui*: *Tr. cuniculi* agentul etiologic al treponematozei iepurelui

Istoric. În anul 1905, Schaudinn şi Hoffmann izolează agentul patogen al sifilisului *Treponema pallidum*, iar Castellani, agentul patogen al pianului *Treponema pertenue*. În 1921, Noguchi izolează *Tr. cuniculi* de la iepurele cu spirochetoză spontană. Saenz şi colaboratorii (1938) au găsit treponeme în leziunile bolii pinta. Ulterior, au fost decelate treponeme la o serie de boli neveneriene ca: bejel (Asia Mică), sifilis endemic (Balcani), siti (Gambezia engleză) etc. Cercetările recente au demonstrat că toate aceste treponematoze prezintă înrudiri imunologice. Noguchi izolează treponeme saprofite de pe membranele organelor genitale (*Tr. calligyrum*, 1912, *Tr. genitalis*, 1923) şi din cavitatea bucală (*Tr. mucosum*, *Tr. microdentium*, 1912).

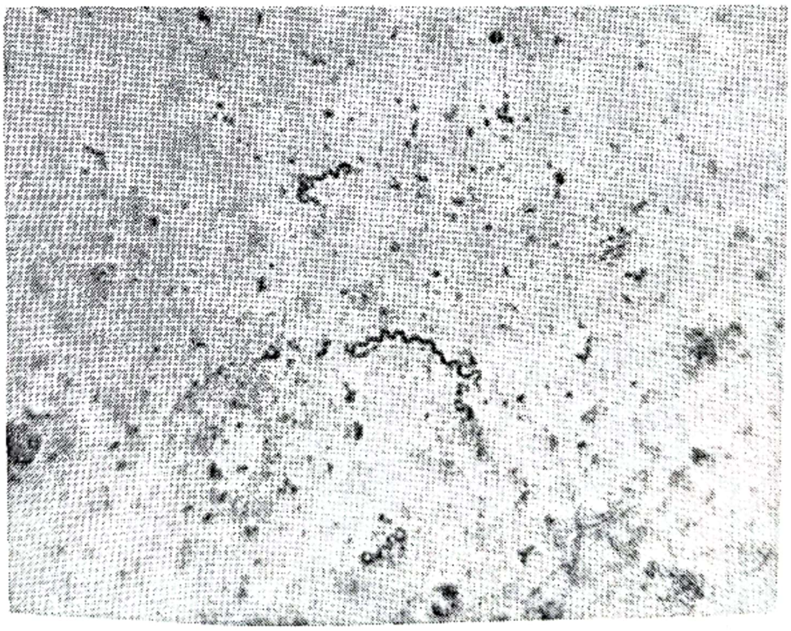


Fig. 151. — *Treponema pallidum* — suspensie de treponeme din testicul de iepure (coloraţie Fontana-Tribondeau) (×900).

Habitat. *Tr. pallidum* se găseşte în organismul omului bolnav, localizată în şancrul primar, fasciile conjunctive, cicatrice, ganglioni

Tabelul LXXVIII

Notarea rezultatelor în reacția de aglutinare-liză pe lamă

	Diluția de ser în tub	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1 600	1/3 200	1/6 400	1/12 800
	Diluția de ser pe lamă după adăugarea antigenului	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1 600	1/3 200	1/6 400	1/12 800	1/25 600
P. G. în vîrstă de 45 de ani Com. Mihăilești, internat în Spitalul Colentina, suspect LEPTOSPIROZA Ser recoltat a 15-a zi de la debutul bolii	*Leptospira icterohaemorrhagiae*	L+ +	L+ +	L+ +	L+ +	L + +	L +	+ +	+	0
	,, *canicola*	L+	L+	+ +	+ +	+	±	0		
	,, *pomona*	L+ +	+ +	+ +	+	+	0			
	,, *grippotyphosa*	0								
	,, *mitis*	0								
	,, *hebdomadis*	0								
	,, *sejroe*	0								
	,, *australis A*	0								
	,, *autumnalis*	0								
	,, *ballum*	0								
	,, *bataviae*	0								
	,, *p. oi*	0								

Rezultat: serul bolnavului P. G. prezintă anticorpi pentru *L. icterohaemorrahagiae* în titrul 12 800 și pentru *L. canicola* și *L. pomona* în titrul 1 600.

limfatici, în tunica vaselor cerebrale, aortei, placentă etc. Poate invada organele fără a determina leziuni, supravieţuind la adăpostul fagocitozei în citoplasma celulelor epiteliale, în ţesutul conjunctiv hiperplaziat etc.

Tr. pertenue şi *carateum* se găsesc localizate în tegumentele omului. *Tr. cuniculi* parazitează organismul iepurelui.

Caractere morfologice şi tinctoriale. Graţie microscopului electronic utilizat în studiul morfologic al treponemelor, s-au putut preciza dimensiunile şi structura lor. Treponemele au o lungime de 6—15 μ, grosime de 0,09 — 0,18 μ, cu spire lungi de 1—1,5 μ (Swain). Microscopul electronic avînd o putere de rezoluţie mare, evidenţiază în anatomia treponemelor: un fascicul axial, format din 3 fibrile (de 0,02 μ grosime fiecare); o citoplasmă cilindrică spiralată şi o membrană fină. Treponemele vii pot fi văzute prin mărimea contrastelor prin condensatorul cardioid (microscopul cu fond întunecat) sau lumină indirectă (microscopul cu contrast de fază).

În preparatele proaspete, treponemele prezintă mişcări active de rotaţie în jurul axului longitudinal, de flexiune şi de translaţie. Indicele de refracţie este diferit de al apei. În soluţiile de glicerină, treponemele devin mai vizibile decît în ser fiziologic. Treponemele se colorează bine prin metodele Fontana-Tribondeau şi Giemsa.

Caractere de cultură. Treponemele patogene nu au putut fi cultivate în serie pe medii artificiale. Dintre numeroşii cercetători care au încercat cultivarea treponemelor *in vitro* Schereschevski, Noguchi, Wasserman etc. au obţinut culturi pozitive.

Ulterior s-a dovedit că toate aceste culturi erau treponeme saprofite, fie greşit identificate ca *Tr. pallidum*, fie — mai puţin probabil — mutante ale celor patogene devenite mai puţin exigente.

Treponemele patogene sînt cultivate *in vivo* pe testiculul de iepure. Multiplicarea lor se face prin diviziune transversală.

Din anul 1926, se cunoaşte sub numele de treponema „Reiter" o tulpină nepatogenă pentru animalele de laborator, care se cultivă cu uşurinţă pe medii cu bulion glucozat 0,1% şi ser de iepure 10% sau mediul Brewer în anaerobioză la 37°. Spre deosebire de *Tr. pallidum*, treponemele saprofite sînt mai groase, mai lungi şi cu mişcări mai lente.

Formula mediului Brewer (Difco, 1948)

Hidrolizat de caseină	15 g
Extract de levură (drojdie de bere)	5 g
Glucoză	5 g
Clorură de sodiu	2,5 g
Resazurină	0,001 g
Agar	0,75 g
Cisteină	0,75 g
Acid tioglicolic	0,3 ml
Apă distilată	1 000 ml

După sterilizare prin filtre Seitz, se adaugă în proporţie de 10% ser de iepure normal, inactivat 30 minute la 56°.

Caracterele biochimice şi de metabolism sînt puţin cunoscute la treponemele patogene.

Rezistenţa la agenţi fizici, chimici şi biologici. Treponemele sînt foarte sensibile la căldură; temperatura de peste 41° le omoară, fapt care a condus la introducerea piretoterapiei în luesul nervos. Uscarea le omoară rapid; apa distilată le imobilizează, iar saponina (10%) le lizează în 2 ore. Congelările și decongelările repetate scad numărul și mobilitatea treponemelor. Serul normal 10% și glicerina $15^{0}/_{0}$ protejează treponemele de acțiunea nocivă a congelărilor și decongelărilor repetate. În sîngele de bolnav, păstrat la +4°, treponemele rezistă 3 zile. Congelarea la −70° conservă treponemele ani de zile cu virulența nemodificată.

Treponemele sînt sensibile la acțiunea penicilinei, eritromicinei, aureomicinei, teramicinei, cloromicetinei și streptomicinei.

Structura antigenică. Tehnicile imperfecte din trecut nu au permis obținerea de culturi pure necesare studiilor de structură antigenică și constituție chimică. Chiar tehnicile moderne, mult perfecționate, nu eliberează complet suspensia de traponeme patogene de substanțele solubile sau urmele din țesutul gazdă (testicul de iepure). Pentru acest motiv, atenția cercetătorilor a fost îndreptată spre *Tr. reiter*, tulpină saprofită, ușor de cultivat și purificat, cu scopul ca, prin analogie, rezultatele cercetărilor să contribuie indirect la cunoașterea treponemelor patogene și explicarea diferitelor aspecte biologice ale treponematozelor.

Tr. reiter, *Tr. nichols* (tulpină patogenă) și *L. biflexa* conțin lipide, albumine, acizi aminați și acizi nucleici în procente asemănătoare.

Din *Tr. reiter* au fost extrase pînă în prezent (1949—1958) următoarele fracțiuni antigenice: antigen proteic (termolabil), antigen polizaharidic (termostabil), antigen lipoidic și antigen lipo-polizaharidic. Folosirea cu succes a suspensiilor de *Tr. reiter*, ca și a fracțiunilor sale antigenice — în special fracțiunea proteică și lipopolizaharidul — în serodiagnosticul sifilisului a întărit ipoteza înrudirii antigenice între tulpina saprofită și treponemele patogene (Pavlatou, Brown, Beker, 1959).

Dardanoni (1955) demonstrează complexitatea antigenică a treponemelor patogene și înrudirea lor cu cele saprofite prin decelarea în serurile iepurilor, inoculați cu suspensii purificate de treponeme patogene, (tulpina Nichols) a anticorpilor antilipoizi și antitreponemici de grup care reacționează cu antigenul proteic purificat din *Tr. reiter* și a anticorpilor imobilizanți și fixatori care reacționează cu *Tr. nichols*.

Din *Tr. pallidum* (tulpina Nichols) a fost extras un antigen de natură proteică, cu o mare putere fixatoare specifică față de serurile sifilitice (Portnoy și Magnuson, 1955). Siefert (1958—1959), desfăcînd antigenul proteic prin electroforeză în 5 fracțiuni, arată că numai trei din ele răspund de activitatea serologică. Scopul cercetărilor, care au luat un mare avînt în ultimii ani, este de a găsi o fracțiune antigenică specifică care să permită un diagnostic de certitudine a diferitelor treponematoze, evitînd reacțiile biologice fals pozitive, care sînt legate de antigenul lipoidic, larg răspîndit în materia vie.

Prin probele de sensibilitate la antibiotice, testele serologice, imunitate încrucișată, s-a putut stabili și înrudirea antigenică între diferitele treponeme patogene ale omului cu cele ale iepurelui (Turner, 1959).

Caractere de patogenitate. Din punctul de vedere al patogenității, treponemele se împart în patogene și saprofite. *Tr. pallidum* (tulpina Nichols) și-a păstrat patogenitatea pentru om și după 42 de ani de întreținere pe iepure, dovedită prin infecții accidentale de laborator. *Tr. pertenue* este considerată ca o formă de variație a *Tr. pallidum*, cu afinități dermotrope stabile și cîștigate printr-un lung proces istoric de adaptare, în care condiţiile climatice, au jucat, se pare, un rol important. Turner citează două cazuri, în care s-a observat trecerea *Tr. pertenue* în *Tr. pallidum* (după 9 şi 26 de treceri pe iepure). Infecţia de lungă durată pare să favorizeze, în populaţia treponemelor pianice, germenii ce prezintă caracterele treponemelor sifilitice.

La treponemele patogene nu au fost puse în evidenţă exo- sau endotoxine, deşi unele aspecte histologice sugerează posibilitatea prezenţei lor.

Boala spontană la om şi animale. *Tr. pallidum* trece de la om la om prin contact sexual şi în 0,01% din cazuri printr-un contact de convieţuire, prin lenjerie, tacîmuri, toaletă comună etc. sau prin infectare profesională.

Infecţia primară se caracterizează prin apariţia şancrului la locul de pătrundere a treponemelor, după o incubaţie de 2—4 săptămîni, prinderea ganglionilor regionali şi generalizarea infecţiei. În timp de 10—40 de zile, şancrul se vindecă spontan. După 2—6 luni, apar manifestări clinice generale, leziuni cutanate şi ale mucoaselor (sifilisul secundar). Leziunile dispar fără tratament în 1—3 luni, putînd reapare după o fază de latenţă de 3—12 luni. Infecţia trece apoi într-o stare latentă, în cursul căreia apar leziunile necrotice în ţesuturi şi gomele sifilitice (sifilisul terţiar). Sifilisul nervos se manifestă prin meningoencefalită difuză, tabes şi nevrită optică. Infecţia la om provoacă următoarele modificări sanguine : mononucleoză şi uşoară anemie, leziuni ale sistemului vascular cu neoformaţii vasculare şi infiltraţii celulare (limfomononucleare, plasmocite, polinucleare).

Majoritatea deceselor sînt date de leziunile cardio-vasculare şi ale sistemului nervos.

Alte treponematoze ale omului, neveneriene. Pianul este o boală tropicală, cu manifestări cutanate, provocată de *Tr. pertenue*. Ea prezintă 3 perioade : primară, manifestată printr-un şancru extragenital, perioada secundară, manifestată prin erupţii papulopustuloase şi perioada terţiară cu gome superficiale.

Pinta este o boală frecventă în America de Sud, provocată de *Tr. carateum* şi seamănă din punct de vedere clinic cu vitiligo, respectînd însă mucoasele şi organele genitale.

Bejel este o boală răspîndită în Arabia şi India, considerată ca o formă atenuată a sifilisului.

Treponematoza spontană a iepurelui. Iepurele este singurul animal care face o boală venerică spontană, provocată de *Tr. cuniculi*.

Boala experimentală. În general, toate mamiferele sînt mai mult sau mai puţin susceptibile la infecţia cu treponeme. Animalele cele mai sensibile, folosite în laborator în scop experimental sau pentru diagnostic, sînt : maimuţa, iepurele, hamsterul şi şoarecele.

Inocularea intrapalpebrală sau intrapreputială la cimpanzei (Mecinikov şi Roux, 1909) este urmată, după 10—12 zile, de apariţia şancrului. După 8—10 săptămîni apar erupţiile cutanate — fenomenele secundare — iar la unele animale apar tardiv şi fenomenele terţiare, gomele.

Iepurele este animalul cel mai folosit în laborator pentru izolarea şi întreţinerea tulpinelor de *Tr. pallidum*. Sensibilitatea acestui animal este atît de mare, încît sînt suficiente doar două treponeme pentru producerea infecţiei (Magnuson, 1948). Prin inocularea intratesticulară la iepure a exsudatului raclat de pe suprafaţa şancrului sifilitic, se produce o indurație a testiculului în primele 2 săptămîni, care progresează pînă la a 6-a — a 7-a săptămînă. Şancrul este însoţit de o adenopatie regională şi septicemie, cu sau fără manifestări secundare. Din punct de vedere histopatologic se notează modificări date de multiplicarea treponemelor (acumulare de material mucoid secretat de treponeme), alterări imunobiologice (infiltraţii mononucleare), şi necroză urmată de un proces inflamator şi reparator.

Inocularea intracorneană provoacă o keratită specifică care poate fi transmisă în serie (Bertorelli, 1906).

Reproducerea bolii experimentale cu treponeme este influenţată de diferiţi factori, printre care mai importanţi sînt :

— Rasele de iepuri, vîrsta, sexul, starea de sănătate, hrana şi condiţiile de întreţinere.

— Temperatura mediului extern. Longhin şi colaboratorii au demonstrat că generalizarea infecţiei sifilitice la iepure se obţine uşor, dacă animalele infectate sînt ţinute la temperaturi scăzute.

— Temperatura tisulară. Leziunile cutanate se dezvoltă în regiunile cu temperaturi mai joase : urechi, labe, coadă, nas.

Temperatura pare să joace un rol important în varietatea formelor clinice a treponematozelor.

— Hormonii. Cortizonul modifică aspectul leziunilor. La locul de inoculare a iepurelui, tratat cu cortizon în perioada de incubaţie, nu se mai produce şancrul sifilitic. La examenul histologic în secţiune, se evidenţiază numeroase treponeme şi ţesut mucoid.

— Anticorpii specifici care rezultă dintr-o infecţie anterioară cu *Tr. cuniculi.* Imunitatea încrucişată dintre sifilis şi pian pe de o parte cu treponematoza iepurelui, pe de altă parte, explică multe din eşecurile reproducerii bolii experimentale, puse pe seama rezistenţei individuale a animalelor. Chiar anticorpii transferaţi de la animalele donatoare (mai ales în infecţiile prelungite) reduc numărul treponemelor active.

Hamsterii au fost folosiţi pentru prima oară de Bessemans şi Geiman pentru izolarea treponemelor. Sînt utili în diferenţierea biologică a *Treponemei pallidum* de *Treponema pertenue.* În timp ce *Tr. pallidum* nu produce leziuni la locul de inoculare, dar se concentrează în cantitate mare în ganglionii limfatici regionali, *Tr. pertenue* determină leziuni dermice intense, iar în ganglionii limfatici regionali se găsesc în număr foarte redus.

Şoarecele alb face o infecţie inaparentă şi nu prezintă şancru de inoculare. Generalizarea infecţiei se face rapid, treponemele fiind prezente în toate ţesuturile, cu predominanţă în piele şi sistemul nervos. Este folosit la diferenţierea *Tr. pallidum* de *Tr. cuniculi.*

Imunitate. Încă din timpul epidemiilor din secolul al XVI-lea se ştia că oamenii bolnavi deveneau rezistenţi la o reinfecţie. După Neisser (1911), Kolle şi Prigge (1934), imunitatea este legată de prezenţa *Tr. pallidum* în organism (premuniţie). Experienţele lui Chesney au demonstrat însă că imunitatea poate persista şi după eliminarea completă a treponemelor. După tratamentul cu penicilină (sterilizare bacteriologică), iepurii își păstrează imunitatea aproximativ un an. Magnuson și Rosenau au arătat că animalele încep să se imunizeze după 3 săptămîni de la inoculare devenind complet imune după 6 luni. Instalarea imunității depinde și de numărul treponemelor infectante.

Cu treponeme omorîte nu s-a obținut o imunizare artificială, deși unele rezultate sugerează posibilitatea ei. În această privință, tehnicile recente de purificare a suspensiilor de treponeme patogene deschid perspective noi.

În serul bolnavilor de sifilis au fost decelați următorii anticorpi :

a) Anticorpi antilipoidici, reagine sau anticorpi Wassermann, puși în evidență de antigenele lipoidice folosite în testele clasice ale serodiagnosticului. Este dovedit azi că aceștia sînt anticorpi specifici corespunzători fracțiunii lipidice din structura antigenică a treponemelor (Eagle, Turner, Schipper etc). Reacțiile serologice pozitive care apar între antigenele lipoidice și serurile reactive din diferite boli neprovocate de treponeme (reacțiile biologice fals pozitive) sînt explicate prin identitatea chimică și antigenică a fosfolipidelor, atît de larg răspîndite în materia vie, capabile de a stimula producerea de anticorpi antilipoidici.

b) Anticorpi puși în evidență prin folosirea ca antigene a suspensiilor purificate de treponeme. În acest grup se cunosc : anticorpi neutralizanți sau protectori, anticorpi imobilizanți, anticorpi aglutinanți, anticorpi fixatori.

Imunitatea este strîns legată de cantitatea anticorpilor imobilizanți și aglutinanți.

Marshak și Rothman, Csonka, constată o sensibilizare a organismului sifilitic la inocularea intradermică cu suspensie purificată de treponeme patogene omorîte. Alergia sifilitică ar explica, după acești cercetători, manifestările tardive și gomele sifilitice.

Tratamentul specific. În tratamentul sifilisului, în afara chimioterapiei specifice cu compuși de arsenic, bismut și mercur, se întrebuințează penicilinoterapia. Introducerea penicilinei a simplificat și scurtat durata totală a tratamentului. Treponemele dispar din leziunea primară în 24—48 de ore de la aplicarea penicilinei. A fost semnalată și acțiunea terapeutică a aureomicinei și cloramfenicolului în infecția sifilitică.

Diagnosticul de laborator

Diagnosticul bacteriologic și serologic al sifilisului se impune nu numai pentru a confirma boala clinică, ci și pentru a descoperi fazele inaparente ale infecției și modificările infecției sub influența tratamentului.

Metodele folosite în diagnosticul sifilisului comportă :

— cercetarea treponemei prin examene directe și izolarea ei prin testul biologic ;

— cercetarea modificăriloer serului sanguin al bolnavului prin examene serologice.

I. Cercetarea prin examene directe a treponemei :

a) *Examenul preparatelor proaspete la microscopul cu cîmp întunecat*

Avem nevoie de : microscop cu condensator cardioid pentru cîmp întunecat, sursă de lumină puternică, lame subțiri ($1-1^1/_2$ mm) curate, transparente și fără zgîrieturi, lamele, ulei de cedru fluid sau glicerină neutră.

Tr. pallidum se găsește aproape în toate leziunile sifilitice, frecvența sa fiind însă variabilă după natura leziunii; șancru ulcerat sau neulcerat, papule, plăci mucoase, gome etc.

Metoda de cercetare. Se detașează crustele și se raclează ușor în periferia șancrului cu un fir de platină sau cu un vaccinostil, pînă la apariția serozității din stratul profund (nu trebuie să sîngereze, pentru a nu jena examenul microscopic). Cu o pipetă Pasteur, se recoltează serozitatea care se depune într-o picătură de ser fiziologic pe o lamă și se acoperă cu o lamelă. După ce se depune o picătură de ulei de cedru (glicerină) pe condensator, se aplică lama de examinat. Examinarea la microscop se face cu obiectiv uscat 20 sau 40 și cu ocular 10 sau 15.

În caz pozitiv, pe fondul negru al preparatului se văd treponeme intens luminate cu spire regulate, animate de mișcări de rotație, de flexie. Uneori, se prezintă ca o serie de puncte strălucitoare, așezate unele după altele, deplasîndu-se în linie dreaptă sau sinuoasă. În cîmpul microscopic se mai pot observa globule net rotunde cu contur strălucitor și globule albe mai mari cu granulații refringente.

b) *Examenul frotiurilor colorate. Metode de colorare*

— Metoda Burri. Se depune pe lamă o picătură din serozitatea leziunii și lîngă ea o picătură de aceeași mărime de tuș de China.

După ce se face amestecul cu colțul unei lame șlefuite se întinde frotiul (ca la frotiul de sînge). După uscare, se examinează cu imersia. Treponemele se văd necolorate pe fondul negru al frotiului.

— Colorația Giemsa. Serozitatea din leziuni se etalează cu grijă pe lame pentru a evita deformarea treponemelor. După uscare, frotiurile sînt fixate cu soluție May-Grunwald sau cu alcool metilic, timp de 1—5 minute. Se spală cu apă neutră și se pun în baie cu soluție Giemsa, în proporție de 3 picături la 2 ml apă distilată neutră, lăsîndu-se 8—24 de ore. Se spală cu apă de robinet și se examinează după uscare cu imersia. *Tr. pallidum* se colorează în violet-roșcat.

— Metoda Zuelzer. Se fixează frotiurile cu acid osmic (vapori sau soluție 10%) și apoi se colorează cu soluție Giemsa, timp de 24 de ore, la temperatura de 50°. Diferențierea se face cu acetonă și xilol.

— Metoda dublei colorații cu soluție Giemsa la 37°, timp de 60 de minute, descrisă la capitolul „Leptospira".

— Metoda rapidă de colorare cu mercurocrom (metoda Meyer). Lama se acoperă cu soluție apoasă de mercurocrom 2% (3—5 secunde), se spală și se colorează cu soluție de violet de metil 2% (3—5 secunde). După spălare și uscare se examinează cu imersia.

— Metoda Fontana-Tribondeau de impregnare argentică.

Reactivii și prepararea lor:

Soluția Rügge (cu acțiune deshemoglobinizantă și fixatoare):

— formol 2 ml, acid acetic 1 ml, apă distilată 100 ml.

Soluția de acid tanic 5% (mordant):

— acid tanic 5 g, apă distilată 100 ml, acid fenic 1 ml. Se filtrează înainte de întrebuințare.

Soluția de nitrat de argint: nitrat de argint 5 g, apă distilată 100 ml. Soluția amoniacală de nitrat de argint se prepară în momentul impregnării argentice. Peste o cantitate de nitrat de argint 5% se picură amoniac, pînă cînd precipitatul maroniu devine opalescent. Se filtrează şi lichidul clar obţinut se foloseşte la impregnare.

Tehnica impregnării. Frotiurile nefixate, uscate, sînt acoperite cu soluţie Rügge care se schimbă de trei ori într-un minut. Se spală cu apă distilată. Se acoperă cu soluţie de acid tanic 5%, se încălzeşte uşor şi se menţine 3 minute. Se spală bine cu apă distilată şi se acoperă lama cu soluţia amoniacală de nitrat de argint. Se încălzeşte pînă la emisiunea vaporilor şi se lasă 10 minute. Se spală cu apă distilată, se usucă şi se examinează cu imersia.

— Metoda Manuelian pentru cercetarea *Tr. pallidum* în secţiuni de organe. Fragmente de organe de circa 1—2 mm grosime sînt fixate în formol 10%, timp de o oră şi apoi trecute în alcool de 96°, de 3 ori cîte 30 de minute. Se spală cu apă distilată care se schimbă de două ori în 5 minute. Se introduc fragmentele în soluţie de nitrat de argint 2% în flacoane cu pereţi de culoare închisă. Se ţin la termostat (37°), timp de 3 zile. Piesele sînt scoase din soluţia de nitrat de argint — la întuneric — se spală în apă distilată şi se trec în soluţia reducătoare proaspăt preparată din: acid pirogalic 4 g; formol 5 ml; apă distilată 100 ml. Se lasă 24 de ore la temperatura laboratorului şi întuneric. Se scot fragmentele şi se spală cu apă neutră bidistilată. Urmează deshidratarea în alcoolurile etilice şi amilice, parafinarea, includerea, tăierea, întinderea etc., ca în tehnicile obişnuite de anatomie patologică. Treponemele apar colorate în negre-brune, iar ţesutul în galben.

II. **Izolarea treponemelor prin metoda biologică.** Pentru a izola treponemele din produse patologice sau pentru a demonstra patogenitatea lor, se recomandă inocularea la animalele de laborator sensibile (vezi capitolul Infecţia experimentală). Produsele patologice cercetate în mod frecvent sînt: serozitatea obţinută după gratarea leziunilor primare sau secundare, lichidul din puncţia ganglionilor limfatici, exsudatul flictenelor produse printr-un vezicator sau fragmentele din ţesutul suspect recoltat prin biopsie. În mod curent, produsele patologice sînt inoculate pe cale intratesticulară la iepure. După 2—6 săptămîni de la inoculare, animalul face o orhită sifilitică, urmînd generalizarea treponemelor în tot organismul iepurelui. Produsele patologice mai pot fi inoculate subcutanat sau intracutanat, în scrot etc., iar dacă sînt infectate şi cu alţi germeni, se poate încerca şi calea conjunctivală sau corneană. Deoarece iepurii fac leziuni spontane cu *Tr. cuniculi*, se recomandă testarea patogenităţii treponemelor izolate de la iepure, pe şoarecele alb.

III. **Examenele serologice.** Progresele realizate în obţinerea suspensiilor purificate de treponeme patogene au permis cunoaşterea structurii antigenice şi fundamentarea testelor clasice de serodiagnostic pe baze ştiinţifice, deschizînd totodată o nouă etapă cu largi perspective în diagnosticul serologic specific al treponematozelor, prin folosirea ca antigene a suspensiilor sau extraselor de treponeme.

1. *Testele serologice clasice*, pun în evidenţă, pe lîngă anticorpii corespunzători fracţiunii lipidice din complexul antigenic al treponemelor şi anticorpii produşi de alte antigene lipidice, care nu au legătură cu treponemele (reacţiile biologice fals pozitive, sau mai corect reacţiile serologice pozitive cu serurile reactive, nesifilitice).

a) Reacţia Bordet-Wassermann constă în aplicarea reacţiei de fixare a complementului,descoperită de Bordet şi Gengou, în serodiagnosticul sifilisului. Ca antigene au fost folosite extracte alcoolice din diferite organe de om şi animale (ficat şi inimă de om, bou,cobai etc.). Pentru sensibilizarea antigenelor, Sachs a adăugat colesterol. Un progres important în prepararea şi îmbunătăţirea antigenelor lipidice l-a constituit o fosfatidă chimic bine definită „cardiolipina" (Mary Pangborn). Mai tîrziu din vegetale (grîu, soia) s-a extras „setolipina" care posedă aceleaşi calităţi antigenice ca şi cardiolipina, prepararea ei fiind însă cu mult mai puţin costisitoare. Între lipidele: extractele alcoolice din organe, cardiolipina, setolipina, pe de o parte, şi antigenele lipidice din treponeme pe de altă parte, nu sînt deosebiri chimice şi antigenice.

În ţara noastră, se lucrează cu antigenul Bordet-Ruelens (extract alcoolic din muşchi de inimă de bou, epuizat cu acetonă) şi cardiolipină. Antigenele sînt titrate de laboratoarele producătoare în vederea stabilirii puterii specifice anticomplementară şi hemolitică.

Tehnica reacţiei Bordet-Wassermann. Elementele reacţiei sînt:

1. Antigenul Bordet-Ruelens. Diluţia de antigen care trebuie utilizată în reacţie se face în momentul efectuării analizei, conform titrului indicat pe eticheta flaconului (vezi anexa la sfîrşitul capitolului).

2. Serul suspect inactivat 30 de minute la 56° sau lichid cefalorahidian. Nu se folosesc serurile contaminate sau foarte hemolizate, fiind anticomplementare.

3. Sistemul hemolitic format din amestecul în părţi egale a suspensiei hematiilor de berbec 3% cu serul hemolitic antihematii de oaie, diluat (8 u/ml). Sistemul hemolitic se ţine 30—60 de minute la 37°, pentru sensibilizare (vezi anexa).

4. Alexina sau serul proaspăt de cobai. Cu 24 de ore înainte de efectuarea reacţiei, se recoltează sînge prin puncţie cardiacă de la mai mulţi cobai, ţinuţi fără mîncare din ajun.

După desprinderea cheagului, sîngele se păstrează la 4°. A doua zi dimineaţa, serul — după decantare şi centrifugare — este diluat 1/10 în ser fiziologic şi titrat. În reacţia de titrare a alexinei folosim 8 tuburi, în care repartizăm cantităţi crescînde de alexină diluată şi cantităţi fixe de sistem hemolitic. Tubul 9 reprezintă martorul — sistem hemolitic:

Tabelul LXXIX

Schema reacţiei de titrare a alexinei

Tubul	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Alexină diluată 1/10 (ml)	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	—
Soluţie ClNa 8,5 g$^0/_{00}$ (ml)	1,45	1,40	1,35	1,30	1,25	1,20	1,15	1,10	1,5
Sistem hemolitic (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Rezultatul se citeşte după 20 de minute la 37° (sau 10 minute la baia de apă). În reacţia de fixare a complementului se foloseşte o unitate alexină, reprezentată de cantitatea de alexină imediat superioară celei care a produs hemoliza completă. (Dacă hemoliza completă apare în tubul 3, unitatea de alexină este 0,20 ml din diluţia 1/10).

Elementele reacției fiind pregătite, le repartizăm în tuburi de hemoliză conform schemei următoare (tabelul LXXX).

Tabelul LXXX

Schema reacției pentru sînge

Tubul	1	2	3	4	5	6	7	8
Antigen (diluat Conf. titrului)	0,2	0,2	—	0,2	0,2	0,4	—	—
Ser suspect ml	0,1	0,2	0,3	—	—	—	—	—
Ser sigur normal ml	—	—	—	0,2	—	—	—	—
Ser sigur sifilitic ml	—	—	—	—	0,2	—	—	—
Alexină diluată 1/10 (1 u. titrul zilei) ml	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—
Soluție ClNa $8,5^{0}/_{00}$ ml	1	0,9	1	0,9	0,9	0,9	1,3	1,5

Se agită tuburile cu grijă pentru a obține un bun amestec al reactivilor. Se țin apoi tuburile la 37°, 45 de minute. Se adaugă cîte 1 ml din sistemul hemolitic în fiecare tub. Se amestecă din nou cu grijă și se trec la 37°. După 10—15 minute, se controlează mersul reacției. Cînd în tuburile 3, 4, 6 și 7 avem o hemoliză totală, citim reacția. Rezultatele le însemnăm în modul următor: reacție negativă, cînd hemoliza este totală în tubul 1 și 2; intens pozitivă — cînd este fixare totală în tuburile 1 și 2; pozitivă — cînd avem o fixare incompletă în tubul 1 și fixare totală în tubul 2 și slab pozitivă, cînd hemoliza este totală în tubul 1 și fixare în în tubul 2.

Lichidul cefalorahidian care conține sînge va fi centrifugat și inactivat înainte de reacție. Cantitatea de proteine și de anticorpi lipoidici conținuți în lichidul cefalorahidian, fiind mult mai reduse față de cele din serul sanguin, se va utiliza o cantitate mai mare de lichid cefalorahidian. Reacția se va efectua după minimum 12 ore de la recoltarea lichidului.

Tabelul LXXXI

Schema reacției pentru lichidul cefalorahidian

Tubul	1	2	3	4	5	6	7
Antigen (diluat cf. titrului) ml	0,2	0,2	0,2	—	0,4	—	—
Lichidul cefalorahidian ml	0,2	0,5	1	1,3	—	—	—
Alexină diluată 1/10 (1.u.) ml	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—
Soluție ClNa $8,5^{0}/_{00}$ ml	0,9	0,6	0,1	—	0,9	1,3	1,5
	45 de minute la baie de apă 37°						
Sistem hemolitic ml	1	1	1	1	1	1	1

Tuburile se repun la baia de apă. Citirea se face cînd în tuburile 4, 5 şi 6 s-a produs hemoliza. În tubul 7, trebuie să fie fixare completă. Cînd alexina este activă, hemoliza se produce de obicei în 15—20 de minute, în caz contrar, tuburile se scot de la baie după 30 de minute. Rezultatele se notează în felul următor : reacţie negativă — cînd hemoliza este completă în toate tuburile, reacţie intens pozitivă—cînd este fixare în tuburile 1, 2 şi 3, reacţie pozitivă —cînd este hemoliză totală în tubul 1 şi 2 şi fixare în tubul 3 şi reacţie slab pozitivă — cînd hemoliza este totală în tuburile 1 şi 2 şi parţială în tubul 3.

Tehnica clasică a reacţiei Bordet-Wassermann a suferit numeroase modificări. Aproape fiecare ţară are o tehnică standard, proprie. Printre perfecţionările aduse, amintim reacţiile cantitative : Calmette-Massol şi Kolmer. În prima reacţie se folosesc diluţii de alexină, iar în a doua, diluţii de ser.

În nenumărate variante ale reacţiei Hecht (1909) se foloseşte serul proaspăt de bolnav, fie pentru înlocuirea hemolizinei sau a alexinei, fie a ambelor (Nicolau şi Dănilă, 1958).

Una din preocupările actuale ale Comitetului de experţi din O.M.S. este perfecţionarea şi standardizarea pe plan internaţional a antigenelor şi a metodelor de lucru.

b) Reacţiile de floculare. Anticorpii din serul sifilitic formează cu antigenul lipidic un complex antigen-anticorp exprimat macroscopic printr-o reacţie de floculare. Aceste reacţii pot fi executate pe lamă ca reacţia Kline, reacţia Mazzini, reacţia V.D.R.L. (Veneral Disease Research Laboratory), sau în tuburi, ca : reacţia Citochol, Kahn, Meinicke etc. S-au folosit, de asemenea, micrometode cu sînge uscat (Chediak, Ko Da guo) sau cu cantităţi foarte mici de ser (micrometoda Kolmer, Wassermann etc.). În ţara noastră, (Nicolau şi Dănilă) folosesc următoarele reacţii de floculare :

Reacţia Citochol. Constă dintr-o modificare a reacţiei Sachs-Georgi, făcută de Witebski. Antigenul utilizat este un extract alcoolic colesterinat de inimă de bou, de trei ori mai concentrat. *Executarea reacţiei* : antigenul se diluează în modul următor : peste 1 ml antigen, se pune cu pipeta gradată 2 ml apă sărată 3% şi se amestecă brusc, aspirînd şi suflînd lichidul cu pipeta de 5—6 ori ; se lasă 5 minute în repaus şi se adaugă cu o pipetă de 10 ml încă 9 ml apă sărată 3%. Într-un tub de hemoliză se pun în contact : 0,2 ml antigen diluat cu 0,2 ml ser de cercetat, inactivat. După ce se agită 3 minute, se adaugă 1 ml ser fiziologic. Se agită din nou cîteva secunde şi se citeşte reacţia imediat cu lupa sau la aglutinoscop.

Reacţiile pozitive sînt notate cu cruci (de la + pînă la ++++) după intensitatea floculării.

Lichidul cefalorahidian trebuie să fie limpede (la nevoie centrifugat) ; se inactivează o jumătate de oră la 37°. În reacţie se întrebuinţează 0,5 ml lichid cefalorahidian inactivat şi 0,1 ml din diluţia de antigen. Se agită bine 3 minute, după care se citeşte rezultatul, cu lupa sau aglutinoscopul. Rezultatele obţinute cu această reacţie vor trebui, în mod obligatoriu, controlate cu reacţia Bordet-Wassermann. Reacţia citocol fiind foarte sensibilă este recomandată ca reacţie de orientare în depistarea sifilisului.

Reacția Meinicke. Material: antigen $M.K.R_2$ (Meinicke-klärungsreaktion) este un extract alcoolic de inimă la care s-a adăugat balsam de Tolu și albastru Victoria; ser de examinat *neinactivat* proaspăt, perfect limpede, fără hematii sau alte particule; soluție de clorură de sodiu 3,5%, preparată cu NaCl chimic pur, în apă bidistilată.

Executarea reacției:

a) *Diluarea antigenului.* În 2—3 eprubete Pyrex de 17×170 se repartizează 0,5 ml antigen brut în prima eprubetă și 5 ml apă sărată 3,5%, în a doua. Eprubetele se astupă bine cu vată ordinară și se pun la baie de apă la 55—56°, împreună cu a treia eprubetă în care se pune apă simplă sau apă sărată și un termometru de laborator de 60° pentru controlul temperaturii. Cînd termometrul din eprubeta de control arată temperatura de 55—56°, se amestecă brusc apa sărată cu antigenul (turnînd apa sărată peste antigen). Eprubeta cu acest amestec se mai ține încă 2 minute în baie, pentru maturare. Apoi se scoate din baie și se amestecă de cîteva ori aspirîndu-l și respingîndu-l cu o pipetă de 1 ml.

b) *Reacția propriu-zisă* are loc într-un tub de hemoliză în care se pun în contact 0,2 ml ser de cercetat cu 0,5 ml antigen diluat. Se agită și se păstrează la temperatura laboratorului, timp de 16 — 20 de ore, acoperit, și la întuneric.

Notarea rezultatelor reacției se face în funcție de aspectul lichidului supernatant și cantitatea precipitatului depozitat pe fundul eprubetei:

— reacția intens pozitivă (++++): sedimentul de pe fundul tubului este abundent, iar supernatantul complet clarificat, ca apa de stîncă;

— reacția pozitivă (+++): sedimentul de pe fundul tubului este bine organizat, iar supernatantul aproape complet clarificat cu o ușoară nuanță de opalescență;

— reacția slab pozitivă (++): depozitul este ușor crescut, iar supernatantul cu tendință spre oarecare clarificare;

— reacția dubioasă (+): la fundul tubului se formează o ușoară sedimentare, iar supernatantul rămîne tulbure cu un foarte slab început de clarificare;

— reacția negativă (—): lichidul rămîne tulbure, asemănător cu amestecul de ser + antigen diluat de la începutul reacției, cu deosebirea că la fundul tubului de hemoliză se formează un mic buton caracteristic reacției negative.

Pentru lichidul cefalorahidian se folosește același antigen diluat și reacția se practică în 3 tuburi cu cantități diferite de lichid cefalorahidian:

Tubul	1	2	3
Lichidul cefalorahidian	0,5 ml	0,2 ml	0,1 ml
Antigen diluat	0,1 ml	0,1 ml	0,2 ml

Citirea se face tot după 16—20 de ore, iar intensitatea reacției se notează ca mai sus.

Reacția Kahn. Este socotită cea mai sensibilă și cea mai specifică dintre reacțiile de floculare recomandate pentru depistarea sifilisului.

Material. Antigenul este un extract alcoolic colesterinat din pulbere de inimă de bou, extras în prealabil cu eter. Serul de bolnav absolut limpede, inactivat 30 de minute la 56°. Micropipete de 0,1 ml, divizate în sutimi de ml. Agitator electric (Kahn).

Executarea reacției. Antigenul este diluat cu ser fiziologic, conform indicației de pe eticheta flaconului. După 10 minute, antigenul diluat este repartizat în 3 tuburi în cantități descrescînde. Serul de cercetat se adaugă în cantitate constantă.

Tabelul LXXXII

Schema reacției

Tubul	1	2	3
Antigen diluat	0,05 ml	0,025 ml	0,0125 ml
Ser de bolnav	0,15 ml	0,15 ml	0,15 ml
	Se agită timp de 3 minute		
Ser fiziologic	1 ml	0,5 ml	0,5 ml

După adăugarea serului fiziologic, se agită din nou cîteva secunde și se examinează la lumină difuză cu o lupă sau cu ajutorul unei oglinzi concave.

Notarea rezultatelor. Intensitatea floculării în fiecare din cele 3 tuburi ale reacției se notează ținînd seama de cantitatea precipitatului și aspectul lichidului, cu: ++++, +++, ++ și +. Se compară apoi notația obținută cu notația de mai jos, dîndu-se rezultatul corespunzător (tabelul LXXXIII).

Tabelul LXXXIII

	Tubul I	II	III	Rezultate
1	++++	++++	++++	++++
2	+++	++++	++++	++++
3	++	++++	++++	+++
4	+	+++	++++	+++
5	−	+++	++++	++
6	−	++	++++	++
7	−	±	++++	+
8	−	−	+++	+
9	−	±	++	+
10	−	±	+	±
11	−	−	+	−
12	−	−	−	−

Valoarea serologiei cu antigene lipidice. Serologia lipidică nu poate avea valori absolute. Prin testele clasice se obțin rezultate pozitive și în alte boli: tripanosomiază, lepră, paludism, boli cașectizante, intoxicații cronice, sarcină etc. În sifilis dau rezultate negative în faza de incubație și infecție primară, pînă în a 12-a zi de la apariția șancrului, în faza terțiară (gome profunde), sifilisul congenital și malign precoce, sifilisul latent și tratat și uneori în recăderile care nu reactivează serologia.

2. *Testele serologice moderne.* Pun în evidență anticorpi cu specificitate de gen sau tip, folosind ca antigene suspensii sau extrase de treponeme. Din cauza dificultăților tehnice de preparare a antigenelor, aceste teste nu au intrat în practica curentă (Turner, 1959).

a) Reacția de imobilizare a treponemelor (Nelson și Mayer). În această reacție se folosesc treponemele extrase din testiculii iepurilor infectați cu tulpina Nichols (patogenă), după incubație de 12 zile. Suspensiile test conțin 50—100 milioane treponeme/ml în 15% glicerină și se conservă la —70°. Treponemele vii, puse în contact cu serul bolnavului și alexina, se introduc în incubator la 35°, în condiții de anaerobioză. După 24 de ore, se compară la microscopul cu fond întunecat, proporția treponemelor mobile față de martori.

Tehnica reacției. — Testiculele infectate sînt tăiate în felii foarte subțiri (4 mm) și spălate în ser fiziologic steril.

— Se introduc în mediul Nelson-Mayer, care are următoarea formulă: serumalbumină bovină cristalizată 5%, pH 7—40 ml; soluție tampon-fosfat, pH 7,1—12,5 ml; tioglicolat de sodiu 1,5% în ser fiziologic — 1,2 ml; soluție glutation, 1,23% în ser fiziologic — 2,5 ml; soluție de piruvat de sodiu (acid piruvic 0,69% în ser fiziologic, pH 7) — 1 ml; soluție bicarbonat de sodiu 1,26% în apă distilată — 4,8 ml și 85 ml ser fiziologic.

— Se obține o suspensie de treponeme care este incubată la 35°, în atmosferă de azot (94%) și bioxid de carbon (5%).

— Se agită ușor pentru a ușura difuzarea treponemelor în mediu, timp de 4—5 ore și se centrifughează 5 minute la 2 000 t/min.

— Supernatantul se controlează la microscopul cu fond întunecat. Suspensia de treponeme se diluează în mediul Nelson-Mayer pentru a ajunge la concentrația de 5 treponeme pe cîmp.

Schema reacției

Tub de reacție		Tub martor	
Suspensia de treponeme	0,4 ml	Suspensia de treponeme	0,4 ml
Ser suspect inactivat	0,05 ml	Ser suspect inactivat	0,05 ml
Alexină proaspătă	0,05 ml	Alexină încălzită 56°	0,05 ml

Tuburile sînt incubate timp de 15—18 ore, la 35°, în atmosferă de azot și bioxid de carbon. Se citește reacția, notînd raportul dintre treponemele mobile și imobile, pe un număr de cel puțin 50 spirochete. Reacția este dificilă și pentru faptul că necesită numeroși martori.

b) Reacția de aglutinare. Hardy și Nell obțin suspensii concentrate și nesensibilizate de treponeme. Ei folosesc următoarea tehnică: iepurii infectați cu $2{,}5 \times 10^7$ treponeme în volum de 0,5 ml, sînt injectați cu cortizon intramuscular, în doza zilnică de 6 mg/kilocorp, din a treia zi pînă la sacrificare. Cînd apare orhita, iepurele este anesteziat și sîngerat „à blanc”, din carotidă. Testiculii se introduc în soluție de citrat de sodiu și se agită timp de 3 ore la 4°. Lichidul conține numeroase treponeme. Se fac două extrageri în soluție de citrat de sodiu. Fiecare suspensie este centrifugată la 1 000 t/min., timp de 5 minute, apoi supernatantul se recentrifughează la 35 000 t/min., timp de 30 de minute la 4°. Depozitul este reluat în ser fiziologic pentru a obține o densitate de 10^9 treponeme. Se încălzește la 83° și se adaugă mertiolat de sodiu 0,01%. Suspensia de treponeme este diluată 1/20 în soluție tampon 0,1 M, pH = 7,6.

Testul de aglutinare este mult mai simplu decît testul de imobilizare. Suspensia de treponeme se pune în contact cu serul de cercetat, diluat 1/10, în volume de 0,1 ml (diluția serului se face în soluție de tetraacetat de etilen-diamină 0,05 M, pH 7,6). Amestecul se ține 18 ore la temperatura de 37° (baie de apă). Examenul se face la microscopul cu fond obscur. Rezultatul este pozitiv, cînd treponemele sînt aglutinate. Treponemele încălzite la 83° sînt mai sensibile la aglutinare.

c) Reacția de imunaderență — dispariție a treponemelor. Nelson a constatat că hematiile umane în prezența serului imun și a alexinei elimină treponemele din supernatant, după o centrifugare la mică turație.

Tehnica: 0,7 ml antigen (10 milioane treponeme/ml)
0,1 ml ser normal de iepure sau de om
0,1 ml ser de cercetat
Incubare: 30 de minute la 37°
0,2 ml sînge uman normal
Incubare: 30 de minute la 37°
Centrifugare: 5 minute la 500 t/min. Se numără treponemele rămase în supernatant.

d) Reacția de fixare a complementului. (R.F.C.) Portnoy și Magnuson (1955) prepară un antigen prin tratarea suspensiei purificate de treponeme (tulpina Nichols) cu acetonă, eter și dezoxicolat de sodiu. În compoziția chimică a antigenului, proteinele totale sînt în proporție de 21—30%, azotul 7,3% și fosforul 1,7—2%. În (R.F.C.), antigenul se folosește diluat 1/5.

D'Alessandro (1958) a folosit un antigen lipopolizaharid din *Treponema Reiter* (tulpina nepatogenă). Specificitatea lui este dovedită prin absența reacțiilor biologice fals pozitive, date de antigenele cardio-lipidice.

Studiindu-se comparativ valoarea testelor serologice TPI (testul de imobilizare), VDRL pe lamă, (R.F.C.) Kolmer cu antigene cardio-lipidice, s-a constatat că anticorpii imobilizanți apar mai tîrziu decît anticorpii lipoidici și TPI se remarcă printr-o înaltă specificitate (Anderson și Kent, 1959).

Interpretarea rezultatelor TPI, în comparație cu testele clasice, este rezumată de Nicolau și Dănilă, după Doepfmer, în felul următor:

1. Reacțiile clasice și de imobilizare: negative.
— nu este sifilis;
— este sifilis primar și secundar, incipient negativat prin tratament.
2. Reacțiile clasice pozitive și reacția de imobilizare negativă:
— nu este sifilis, serologia clasică pozitivă, nespecifică;
— este sifilis primar sau secundar;
— sifilis latent.
3. Reacțiile clasice negative, reacția de imobilizare pozitivă:
— sifilis tratat sau netratat;
— sifilis absent (anticorpi pasivi trecuți prin placentă de la mamă la făt).

4. Reacțiile clasice și de imobilizare: pozitive:
— sifilis tratat sau netratat;
— sifilis absent (anticorpi pasivi la făt).

Dintre anticorpii antitreponemici, anticorpii fixatori apar cel mai precoce (Hederstedt, 1959).

e) Testul de imunfluorescență. Deacon și colab. (1957) aplică metoda imunfluorescenței, descrisă de Coons, la diagnosticul sifilisului. Principiul metodei constă în evidențierea complexului antigen-anticorp cu ajutorul serului antiglobulinic cuplat cu o substanță fluorescentă (izotiocianat de fluoresceină).

Borrel și Durel (1959) folosesc tehnica următoare:

— Se prepară lame cu picături din suspensii de treponeme Nichols, în concentrație de 10—20 pe cîmpul microscopic, care se usucă la 37—40°. Lamele cu antigen pot fi păstrate la +4° timp îndelungat.

— O picătură din serul de cercetat, inactivat și diluat 1/10 în ser fiziologic, se așază peste picătura uscată de antigen. După 30 de minute de contact se spală bine cu ser fiziologic pentru înlăturarea urmelor de proteină.

— Se adaugă o picătură de ser antiglobulinic conjugat cu substanța fluorescentă.

— După 30 de minute se spală bine cu apă, se usucă și se acoperă cu o lamelă.

— Examinarea se face la microscop în lumină ultravioletă. Dacă în serul de cercetat sînt anticorpi specifici, treponemele devin fluorescente.

Prin ușurința de execuție tehnică și prin specificitatea sa, acest test are cele mai largi perspective de a intra printre reacțiile serologice specifice de rutină pentru diagnosticul sifilisului.

Pe plan internațional, cercetările sînt orientate în direcția perfecționării tehnicilor de obținere a suspensiilor de treponeme patogene (medii de cultură, purificări etc.) și a cercetării pe scară largă a specificității și sensibilității diferitelor teste pentru determinarea valorii lor în serodiagnosticul sifilisului.

Epidemiologie

Sifilisul a fost și rămîne una din bolile veneriene de largă răspîndire. Pe tot globul se îmbolnăvesc anual aproximativ 2—4 milioane de persoane. Morbiditatea și mortalitatea cele mai ridicate sînt întîlnite în țările capitaliste și în colonii. În S.U.A., sifilisul a crescut de la 183 422 de cazuri în 1941 la 259 000 în 1949.

În 1944, Brazilia a înregistrat cea mai mare cifră de mortalitate ($47^0/_{0000}$). În țările socialiste, unde ocrotirea sănătății este o problemă de stat, morbiditatea prin sifilis este în continuă scădere. De la 2 $920^0/_{0000}$, morbiditatea în Rusia țaristă, a scăzut în U.R.S.S. la $186^0/_{0000}$.

Sifilisul se transmite prin contact direct sau indirect și congenital. Cel mai important mod de contagiune este raportul sexual. Pătrunderea treponemei este favorizată de prezența soluțiilor de continuitate pe mucoase sau tegumente.

Bolnavul de sifilis poate fi contagios de la contaminare pînă la vindecare. Leziunile deschise din perioada primară și secundară sînt cele mai contagioase.

Treponemele pot fi eliminate și prin urină, lapte, spermă. Durata perioadei de contagiozitate în sifilis depinde de precocitatea depistării și tratamentului aplicat.

Metodele antiepidemice de luptă în focar, urmărirea tratamentului, controlul periodic, educația sanitară etc. stau la baza combaterii și profilaxiei luesului în țara noastră (Nicolau, Homoriceanu și colaboratorii).

Model de calcul pentru obținerea cantităților elementelor titrate

Avem de examinat 70 de seruri, după tehnica Bordet-Wassermann:

1. **Antigenul.** Pentru fiecare ser se folosește antigenul în două tuburi: 2 × 70 = 140 tuburi + 3 tuburi pentru martori = 143 tuburi, în care trebuie să repartizăm antigenul diluat, conform titrului.

a) Dacă titrul antigenului este de 0,2 ml din diluție 1/20, vom avea nevoie de cel puțin 143 × 0,2 = 28,6 ml antigen diluat.

1 ml antigen + 19 ml ser fiziologic = 20 ml 1/20.

1,5 ml antigen + 28,5 ml ser fiziologic = 30 ml 1/20. Din această cantitate repartizăm cîte 0,2 ml/tub conform schemei reacției.

b) Dacă titrul antigenului este de 0,3 ml din diluția 1/18, vom avea nevoie de 143 × × 0,3 = 42,9 ml antigen diluat 1/18.

1 ml antigen + 17 ml ser fiziologic = 18 ml 1/18.

2,5 ml antigen + 42,5 ml ser fiziologic = 45 ml diluție 1/18. Din această cantitate vom repartiza în tuburile corespunzătoare cîte 0,3 ml.

2. **Alexina.** Pentru fiecare ser se folosește alexina în trei tuburi: 3 × 70 = 210 tuburi 4 tuburi martor = 214 tuburi.

Titrul alexinei variază. Dacă este 0,2 ml din diluția 1/10, avem nevoie de 214 × 0,2 = = 42,8 ml alexină diluată 1/10. Preparăm o cantitate mai mare: 4,4 ml alexină + 39,6 ml ser fiziologic = 44 ml alexină diluată 1/10, din care repartizăm cîte 0,2 ml/tub. Dacă titrul este de 0,3 ml din diluția, 1/10, avem nevoie de: 214×0,3 = 64,2 ml alexină diluată 1/10. Preparăm o cantitate mai mare de alexină: 6,5 ml alexină + 58,5 ml ser fiziologic = 65 ml alexină diluată 1/10, din care repartizăm cîte 0,3 ml/tub.

Notă: Cantitățile de antigen și alexină în reacție variază în funcție de titrurile lor. Schema reacției este dată pentru antigenul cu titrul 0,2 ml din diluția 1/20 și alexina cu titrul 0,2 ml din diluția 1/10. În prima parte a reacției (primul sistem), volumul total al elementelor trebuie să fie 1,5 ml. Variațiile cantitative de antigen și alexină sînt corectate prin serul fiziologic. Dacă antigenul are titrul 0,3 din diluția 1/20 și alexina 0,25 ml din diluția 1/10, în primul tub al reacției vom pune: antigen 0,3 ml, ser suspect 0,1 ml, alexină 0,25 ml, completînd pînă la volumul de 1,5 ml cu ser fiziologic, în cazul de față cu 0,85 ml.

3. **Sistemul hemolitic.** Pentru fiecare ser se folosește sistemul hemolitic în trei tuburi: 3 × 70 = 210 tuburi + 5 tuburi de la martori = 215 tuburi = 215 ml sistem hemolitic. Totdeauna avem grijă să preparăm o cantitate mai mare, întrucît o parte din lichid se pierde pe pereții flacoanelor, pipetelor etc.

Diluția hemolizinei. Dacă serul hemolitic are titrul de 3 000 u./ml, îl diluăm pentru a obține o concentrație de 8 u./ml în felul următor: 0,1 ml ser hemolitic + 0,9 ml ser fiziologic = 1 ml hemolizină 1/10 (300 u./ml); 1 ml hemolizină diluată 1/10 + 36,5 ml ser fiziologic = 37,5 ml hemolizină 1/375 (8 u./ml). Pentru nevoile noastre, preparăm din 4 ml hemolizină diluată 1/10+ + 146,8 ml ser fiziologic = 150 ml hemolizină diluată 1/375 (8 u./ml).

Suspensia de hematii se prepară din depozitul hematiilor de berbec, spălate de 3 ori cu ser fiziologic, prin centrifugare 10 minute la 1 000 t/min: 3 ml globule roșii depozit + 97 ml ser fiziologic = 100 ml suspensie hematii 3% (4,5 ml globule roșii + 145,5 ml ser fiziologic).

Diluția de hemolizină și suspensia de hematii se amestecă în părți egale (110 ml hemolizină diluată+110 ml suspensie globule roșii = 220 ml sistem hemolitic.). Concentrația finală a elementelor din sistemul hemolitic va fi: 1,5% suspensie de hematii și 4 u. hemolizină.

Familia Rickettsiaceae

Conf. G. Zarnea

Genul Rickettsia și rickettsiozele

Sub denumirea de *Rickettsia* sînt reunite, într-un gen de sine stătător, o serie de microorganisme pleomorfe, intermediare între bacterii și virusuri, care nu se dezvoltă pe medii artificiale acelulare și care sînt găsite în mod natural în tubul digestiv la diferite artropode.

Un număr mic — circa 11 specii — formează grupul rickettsiilor patogene care parazitează intracelular, în afară de diferite artropode hematofage (păduche, purice, căpușe), o serie de mamifere domestice și sălbatice și chiar omul, la care produce infecții specifice cunoscute sub denumirea de *rickettsioze*.

Restul de peste 40 de specii identificate pînă în prezent sînt nepatogene pentru mamifere și sînt prezente numai la artropode.

Rickettsiozele umane sînt boli febrile — în general exantematice — care evoluează ca infecții generalizate cu leziuni specifice ale vaselor mici togene și cu o letalitate variabilă între 0 și 95%.

Rickettsiile au o mare adaptabilitate, datorită căreia pot supraviețui și chiar se pot multiplica la fel de bine în celulele gazdelor lor homeoterme (om și animale) ca și în mediul foarte diferit și foarte variabil reprezentat de celulele gazdelor poikiloterme — reprezentate de diferite specii de artropode. Datorită acestui fapt, transmiterea lor se realizează — cu excepția febrei Q la om — prin intermediul artropodelor vectoare, prin mecanisme diferite (înțepătură, depunerea dejecțiilor contaminate cu rickettsii pe piele etc.).

Datorită acestei particularități, rickettsiile patogene sînt adaptate la o existență alternativă în organismul mamiferelor și al artropodelor.

Relațiile dintre rickettsii și artropode sînt variabile după gradul lor de adaptare, determinat filogenetic. Astfel, în unele cazuri (tifosul exantematic la păduche) infecția rickettsiană are un efect letal pentru artropod, în timp ce în altele (tifosul murin la purice), care evoluează ca o infecție asimptomatică de foarte lungă durată, perfect compatibilă cu viața vectorului, s-a ajuns la un echilibru perfect cu animalul pe care-l parazitează și cu gazda lor nevertebrată.

În sfîrșit, în alte cazuri adaptarea rickettsiilor este atît de perfectă, încît ele depășesc limitele obișnuite reprezentate de tubul digestiv al artropodelor, invadează corpul acestora, multiplicîndu-se în diferite organe și țesuturi și, în unele cazuri (căpușe), asigurînd transmiterea transovariană a infecției în generațiile următoare.

În aceste cazuri artropodele hematofage joacă, în afară de rolul de transmițători ai rickettsiozelor, și rolul de adevărat rezervor al acestor infecții în natură, de unde pot ajunge la mamifere și om.

Cu excepția tifosului exantematic, rickettsiozele sînt zoonoze, adică boli transmisibile în care infecția la om este legată de o enzootie la animale domestice sau sălbatice, iar unele fac parte din categoria bolilor cu focare naturale.

La rozătoare, la care sînt foarte frecvente, evoluează în general asimptomatic și perioada acută este urmată în general de o infecție cronică latentă de foarte lungă durată. La animalele domestice pot evolua uneori cu manifestări clinice evidente sau, cel mai ades, asimptomatic.

Istoric. Deși unele rickettsioze au fost semnalate ca manifestări clinice și epidemiologice, încă dinaintea erei noastre, primele date privind agenții lor patogeni au apărut în anul 1909, cînd Ricketts, studiind febra pătată a Munților Stîncoși și tifosul exantematic, a descoperit în sîngele bolnavilor și în căpușe o serie de formațiuni caracteristice cu dimensiuni extrem de mici, pe care le-a identificat cu agentul patogen al bolii.

În 1913, cercetătorul ceh Prowazek demonstrează prezența unor formațiuni similare în conținutul intestinal al păduchilor recoltați de la bolnavii de tifos exantematic.

Prowazek și Da Rocha-Lima studiază evoluția infecției rickettsiene la păduche, iar în 1916, Da Rocha-Lima descrie specia tip a întregului grup — agentul patogen al tifosului exantematic — căruia i-a dat numele de Rickettsia prowazeki, în amintirea celor doi cercetători dispăruți în urma unor infecții accidentale, cu ocazia cercetărilor amintite. Aceste rezultate au fost dezvoltate ulterior de un mare număr de cercetători din lumea întreagă. În țara noastră, cercetările în domeniul rickettsiozelor, inițiate de I. Cantacuzino, au fost continuate de C. Ionescu-Mihăiești, M. Ciucă și D. Danielopolu, și dezvoltate de către D. Combiescu.

Clasificarea rickettsiilor. Poziția lor în sistematică

Rickettsiile ocupă în sistematică o poziție intermediară între bacterii și virusuri. Ele sînt asemănătoare bacteriilor printr-o serie de particularități, ca morfologia, dimensiunile, organizarea celulară internă, incluzînd peretele celular și structurile nucleare, compoziția chimică complexă, multiplicarea prin diviziune directă și absența fazei de eclipsă, precum și prin capacitatea de a efectua numeroase funcții metabolice importante. În același timp parazitismul lor obligat intracelular — care determină necesitatea de a le cultiva numai în țesuturile organismelor vii sau în culturi pe țesuturi (deși întîlnite și la unele bacterii) — le apropie mai mult de virusuri.

După cercetările recente, parazitismul obligat intracelular al rickettsiilor — spre deosebire de cel al virusurilor — s-ar explica, cel puțin în parte, prin permeabilitatea foarte mare a peretelui lor celular, care le face foarte sensibile la condițiile variabile ale mediului extern și față de care, localizarea intracelulară le apără.

Ca origine filogenetică se admite că inițial rickettsiile au fost paraziți naturali ai artropodelor, de la care au trecut la mamifere și ulterior la om, prin intermediul vectorilor hematofagi.

În prezent nu există o clasificare unanim admisă a rickettsiilor și rickettsiozelor.

După clasificarea lui Philip (1956), rickettsiile patogene pentru om fac parte din tribul *Rickettsieae*, familia *Rickettsiaceae*, ordinul *Rickettsiales*, Clasa III *Microtatobiotes*.

În acest cadru, tribul *Rickettsieae* cuprinde 2 genuri : *Rickettsia* și *Coxiella*, primul fiind la rîndul său subîmpărțit în 4 subgenuri, după cum urmează :

I. Subgenul A. *Rickettsia* cu speciile :

a) *R. prowazekii* agentul patogen al tifosului exantematic epidemic.
b) *R. mooseri*, sin. *R. typhi*, agentul patogen al tifosului exantematic endemic murin.

II. Subgenul B. *Zinssera*, cu specia tip *R. tsutsugamushi*, sin *R. orientalis*, agentul patogen al febrei tsutsugamushi.

III. Subgenul C. *Dermacentroxenus* cu speciile :

a) *Rickettsia rickettsii*, agentul patogen al febrei pătate a Munților Stîncoși.
b) *Rickettsia conorii*, agentul patogen al febrei butonoase.
c) *R. australis*, agentul patogen al tifosului de căpușe din Queensland.
d) *R. akari*, agentul patogen al rickettsiozei variceliforme.

IV. Subgenul *Rochalimaea*, cu specia tip *R. quintana*, agentul patogen al febrei de tranșee (Wolhynia).

Genul *Coxiella* are ca specie tip *Coxiella burnetii*, agentul patogen al febrei Q.

Clasificarea rickettsiozelor

Rickettsiozele sînt infecții specifice ale omului și animalelor provocate de microorganisme din genul *Rickettsia*. Ele erau cunoscute în trecut sub denumirea, astăzi necorespunzătoare, de febre exantematice, deoarece există unele rickettsioze, ca febra Q, în care infecția la om evoluează fără exantem.

Pe baza particularităților biologice și imunologice ale agentului patogen, a simptomatologiei clinice și epidemiologiei bolii umane, a bolii experimentale la animalele de laborator, ca și pe baza aspectului histopatologic, rickettsiozele umane pot fi împărțite în 5 grupuri, după cum urmează :

I. Grupul tifos cuprinde 3 entități, și anume :

1. tifosul exantematic epidemic de păduche ;
2. tifosul exantematic endemic sau murin ;
3. tifosul exantematic de recădere, boala Brill-Zinsser.

Această ultimă boală este o recrudescență a infecției latente, consecutivă unui tifos exantematic epidemic de primo-infecție.

Bolile din acest grup au următoarele caractere generale : a) agentul patogen este localizat totdeauna intracitoplasmatic și niciodată intranuclear ; b) dau imunitate încrucişată între ele, dar nu imunizează faţă de rickettsioze din alte grupuri de clasificare ; c) evoluează cu leziuni histopatologice caracteristice, de endo- şi perivascularită (noduli Popov-Fraenkel) ; d) determină o boală febrilă la cobai, cu leziuni cerebrale, iar în tifosul murin, cu reacţii scrotale constante ; e) au ca insectă vectoare epidemică păduchele.

II. Grupul febrelor pătate cuprinde :

1. febra pătată a Munţilor Stîncoşi şi tifosul de Saõ Paolo (rickettsioza braziliană), considerate astăzi ca identice ;
2. febra butonoasă mediteraniană sau tifosul de căpuşe şi tifosul de căpuşe din Africa, considerate ca identice sau foarte înrudite ;
3. rickettsioza variceliformă sau rickettsioza veziculoasă ;
4. tifosul (rickettsioza de căpuşe) siberian din Asia de nord ;
5. rickettsioza (tifos) de căpuşe din nordul Australiei (Queensland).

Rickettsiozele din acest grup au următoarele particularităţi : a) agentul patogen se multiplică în mod caracteristic intranuclear şi numai moderat intracitoplasmatic ; b) dau imunitate încrucişată în interiorul grupului, dar nu imunizează faţă de rickettsioze din alte grupuri ; c) evoluează cu leziuni histopatologice caracteristice : trombonecroza vaselor mici, cu invazia muşchilor netezi ai pereţilor vasculari ; d) dau o boală febrilă la cobai, cu leziuni scrotale, necroză şi letalitate pînă la 100% ; e) au ca vector şi ca principal rezervos de virus căpuşele care transmit virusul transovarian la descendenţii lor, iar ca rezervor accesoriu animale domestice şi sălbatice.

III. Grupul tsutsugamushi cuprinde : febra tsutsugamushi şi tifosul de lăstăriş (*scrub-typhus*), considerate azi ca două varietăţi ale aceleiaşi entităţi etiologice.

Agentul patogen se multiplică strict intracitoplasmatic şi numai foarte moderat. Este foarte heterogen din punct de vedere antigenic, ceea ce face ca imunitatea consecutivă bolii sau vaccinării să fie variabilă chiar în cadrul grupului. Nu imunizează faţă de alte rickettsioze. Leziunile histopatologice sînt de tipul vascularitei în focar, cu perivascularită şi leziuni ale vaselor mici şi mari (aortă). Infecţia la om evoluează cu afect primar caracteristic. Vectorul şi rezervorul principal de virus este reprezentat de larvele căpuşelor cu corp roşu (*Trombidiidae*), care transmit infecţia transovarian.

IV. Febra Q — rickettsioza pulmonară.

Agentul patogen — filtrabil — care se multiplică numai intracitoplasmatic, imunizează omolog, dar nu imunizează faţă de alte rickettsioze. Infecţia la om evoluează fără exantem şi fără afect primar. În cazul localizărilor pulmonare are aspect histopatologic de pneumonie interstiţială atipică. Transmiterea la om nu implică în mod obligatoriu participarea artropodelor vectoare.

V. Grupul rickettsiozelor „paroxistice'' cuprinde :

1. febra de Wohlhynia — de tranşee — boală febrilă cu evoluţie paroxistică, recidivantă, benignă, datorită unui agent patogen care trăieşte extracelular în intestinul de păduche ;
2. rickettsioza paroxistică de căpuşe — descrisă de autorii sovietici ca o boală sporadică, benignă, fără exantem şi fără afect primar — datorită unui agent patogen din subgenul *Rickettsia* sau *Dermacentroxenus*.

Tabelul LXXXIV

Clasificarea rickettsiozelor umane

Grupul	Boala	Agentul patogen	Rezervor de infecție	Vectorul	Răspîndire geografică
Tifos	Tifosul exantematic epidemic	*Rickettsia prowazeki*	Omul	Păduchele de corp (*Pediculus corporis*) și de cap (*P. capitis*)	Universală (eradicat sau pe cale de eradicare în multe țări)
	Tifosul exantematic endemic murin	*R. mooseri* (*R. typhi*)	Șobolani, șoareci Evoluție endemică, eventual omul Evoluție epidemică	Purice de șobolan (*Xenopsylla cheopis*) Păduche de corp (*P. corporis*)	America, bazinul Mediteranei, Marea Neagră, Marea Baltică, Extremul Orient, Africa, Australia
	Tifosul de recădere (Boala Brill-Zinsser)	*R. prowazeki*	Fostul bolnav de tifos exantematic, infecție latentă persistentă (premuniție)	Redeșteptarea infecției latente	În regiuni în care sînt foști bolnavi de tifos exantematic
Febre pătate	Febra pătată a Munților Stîncoși	*R. rickettsi*	Rozătoare sălbatice, cîini, oi, căpușe (transovarian)	Căpușe. *Dermacentor andersoni* *Dermacentor variabilis* *Amblyomma americanum*	S.U.A., Canada, Mexic, Brazilia.
	Febra butonoasă	*R. conori*	Căpușe (transovarian) Cîine	Căpușe *R. sanguineus*	Bazinul Mediteranei, Marea Neagră, Asia Mică, India, Africa

Febre pătate	Rickettsioza variceliformă	*R. akari*	Şoarecele de casă	Acarianul gamasid *Allodermanyssus sanguineus*	S.U.A., U.R.S.S.
	Rickettsioza (tifosul) de căpuşe din Asia de nord	*Dermacentroxenus sibiricus*	Căpuşe (transovarian), animale sălbatice mici (şoareci, şobolani de cîmp)	*Dermacentor nutallis* *D. silvarum* *D. marginatus* *Haemaphysalis punctata*	Asia de nord (Siberia şi Extremul Orient)
	Rickettsioza de căpuşe din Australia de nord	*R. australis*	Rozătoare sălbatice şi marsupiale mici	Căpuşe *Ixodes holocyclus*	Australia (Queensland)
Tsutsugamushi	Febra tsutsugamushi (*Scrub typhus*)	*R. tsutsugamushi* (*R. orientalis*)	Căpuşe (transovarian), rozătoare sălbatice, microtine	Larva acarian *Trombicula akamushi* *T. schueffneri* *T. deliensis*	Asia est-sud, Insule Pacific, Indonezia, Australia de nord
Q	Rickettsioza pulmonară (febra Q)	*Coxiella burneti*	Bovine, oi, capre, cai, mamifere sălbatice, păsări, căpuşe (transovarian)	Căpuşe, diptere înţepătoare (numai la animale)	Australia, America, Europa, Asia Mică
Rickettsioze paroxistice	Febra de tranşee (Wolhynia)	*R. quintana* (*R. wolhynica*)	Omul (infecţie cronică latentă)	Păduche de corp (*P. corporis*)	Europa, Asia (în timpul războaielor)
	Rickettsioza paroxistică de căpuşe	*Rickettsia* sau *Dermacentroxenus nov. sp.*	Căpuşe (transovarian), rozătoare microtine	*Ixodes ricinus*	Ucraina

Caracterele generale ale rickettsiilor

Caractere morfologice. Rickettsiile sînt microorganisme foarte asemănătoare morfologic celor mai mici bacterii și caracterizate printr-un polimorfism foarte accentuat, putînd apărea sub formă de coci foarte mici, izolați sau așezați în perechi, cocobacili, bacili sau chiar filamente subțiri și flexuoase, deseori grupate în mase dense intracelulare. Dimensiunile variază între 0,3 × 0,3—0,5 μ, putînd uneori ajunge și chiar depăși 1,5—2 μ în cazul formelor bacilare.

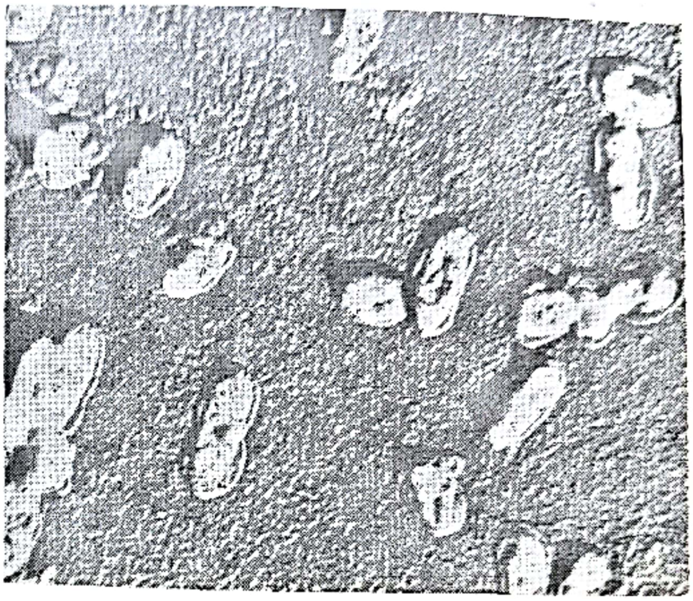


Fig. 152. — *Rickettsia mooseri* — imagine electronografică (×21 000) (Rhodes).

Sînt imobile și nesporulate; Gram-negative; se colorează slab cu coloranții de anilină, exceptînd colorațiile care folosesc soluții cu tampon fosfat sau mordanți. În general, cînd sînt în număr foarte mic, sînt greu de recunoscut, pentru că seamănă cu diferite detritusuri din țesutul care a servit pentru cultivare.

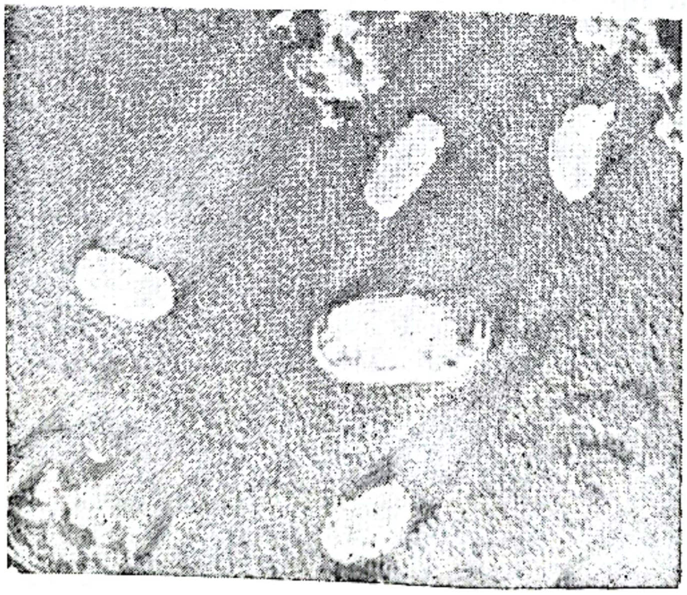


Fig. 153. — *Coxiella burneti* — imagine electronografică (× 11 000).

Între diferitele specii de *Rickettsia* au fost observate diferențe morfologice minime cu ajutorul microscopului cu contrast de fază și al celui electronic.

După Da Rocha-Lima, tipul morfologic caracteristic rickettsiilor este cocul, celelalte aspecte întîlnite în culturi fiind derivate din el, în special n urma creşterii și a diviziunii, fără separarea celulelor-fiice.

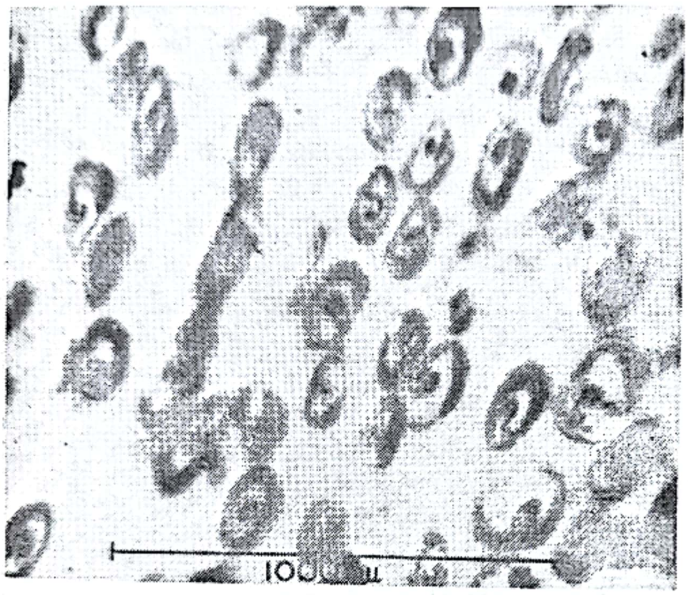


Fig. 154. — Structura internă la *Coxiella burneti* pe secțiuni transversale examinate la microscopul electronic (× 120 000) (Stoker).

P. F. Zdrodovski, studiind pleomorfismul foarte accentuat al *R. prowazeki*, arată că întreaga varietate de forme poate fi redusă la 4 tipuri morfologice (*a* — *d*), care sînt reciproc reversibile și care constituie după acest autor doar faze diferite în dezvoltarea aceluiaşi microorganism :

a) tipul cocoid cu dimensiuni de 0,3—0,4 μ;
b) tipul bacili scurți cu o lungime de 1—1,5 μ;
c) tipul de bacili lungi de 3—4 μ;
d) tipul filamentos, baciliform, de 10—20 μ.

Structura internă a rickettsiilor. Microscopia electronică a arătat existența la rickettsii a unui înveliş capsular extern și a unei membrane limitante de 5—10 mμ, care poate fi considerată că reprezintă peretele celular al acestui organism și corespunde structurii analoge a bacteriilor.

Pe secțiuni de *Coxiella burneti* (Stoker, 1956), s-a demonstrat că în interiorul membranei limitante se observă o zonă intermediară de material granular, comparabilă, dar mult mai puțin densă decît cea corespunzătoare la bacterii. În interiorul acestei zone există un spațiu care conține un corpuscul central, dens, bine definit.

În ansamblu, deci, rickettsiile au o structură internă asemănătoare atît cu aceea a bacteriilor, cît și a virusurilor mari (psittacoza — LGV — vaccina).

Compoziție chimică. Cu ajutorul metodelor citochimice Ris și Fox au arătat prezența la *R. prowazeki* a unei structuri interne conținînd ADRN și amintind structurile nucleare, iar în citoplasmă prezența ARN, ceea ce probează o organizare chimică celulară similară cu a bacteriilor. Mai mult decît atît, la *R. mooseri* purificată, raportul ARN : ADRN a fost de 3,5 : 1 respectiv foarte asemănător cu bacteriile.

În ceea ce priveşte proporţia diferitelor componente chimice (proteine, lipide, glucide, acizi nucleici, cenuşă), rickettsiile ocupă — după Tovarniţki, Krontovskaia şi Ceburkina — o poziţie intermediară între bacterii şi virusuri.

Cu toate că sînt incapabile de proliferare în afara celulei-gazdă, rickettsiile conţin, atît enzime oxidative, cît şi transaminaze. Ele metabolizează glutamatul la oxalacetat după schema : →ketoglutamat→succinat→ →fumarat→oxalacetat.

În constituţia rickettsiilor există deci toate enzimele care participă în aceste reacţii şi lipsesc cele necesare pentru a putea duce o existenţă independentă de celula parazitată.

Colorarea rickettsiilor. Fragmentul de sac vitelin sau de organ (plămîn de şoarece) folosit pentru pregătirea frotiurilor este frecat de capacul unei plăci Petri, pentru a îndepărta excesul de lichid şi a distruge celulele infectate, după care este întins omogen în acelaşi mod pe o lamă obişnuită de microscop, în prealabil bine curăţată şi degresată. Se mai pot folosi amprente de organe (splină, vaginala testiculului, peritoneu) obţinute prin aplicarea lor pe o lamă de microscop.

Coloraţia Macchiavello

I. Fucsină bazică	0,25 g
Apă bidistilată, tampon fosfat pH 7,4	100 ml

(soluţia se foloseşte numai proaspătă, sau conservată cel mult cîteva zile la gheţar)

II. Acid citric	0,5 g
Apă bidistilată	100 ml

(se păstrează la gheţar)

III. Albastru de metilen	1 g
Apă bidistilată	100 ml

Tehnica : se acoperă frotiurile uscate la aer şi nefixate, cu soluţia de fucsină, filtrată prin hîrtie de filtru, şi se lasă timp de 3 minute, după care se îndepărtează colorantul şi se spală la curent de apă.

Se trece apoi repede în soluţia a II-a, fie agitînd lama 15—20 de secunde într-un pahar Borrel, fie turnînd cu o sticlă picătoare, după care este trecută rapid sub un curent de apă la robinet. Se colorează apoi pentru contrast timp de 15 secunde cu soluţia a III-a ; spălare la robinet ; uscare la aer sau cu hîrtie de filtru.

Rickettsiile vii se colorează în general în roşu-rubiniu strălucitor, iar cele decolorate sînt recolorate în albăstrui. Nucleul celulelor apare albastru închis-violet, iar citoplasma albastru clar. Bacteriile se colorează albastru închis-violet.

Coloraţia Zdrodovski este o variantă a coloraţiei Macchiavello, care foloseşte fucsina bazică fenicată obişnuită (fucsină 1 g, fenol 5 g, alcool 10 ml, apă distilată 100 ml, dizolvată în proporţie de 10—15 picături la 10 ml apă bidistilată tamponată cu fosfat la pH 7,4), care are avantajul de a fi mai stabilă.

De asemenea, recomandă fixarea la flacără a frotiurilor, restul coloraţiei decurgînd ca în metoda originală Macchiavello.

Coloraţia Zdrodovski colorează, atît rickettsiile vii, cît şi cele moarte, ceea ce o indică în special pentru aprecierea globală a numărului de rickettsii.

Colorația Graçian, care utilizează colorantul Giemsa, are avantajul de a folosi frotiuri în prealabil degresate cu xilol sau toluol, care îndepărtează o parte din componentele sacului vitelin și mordansate cu soluție de bicromat de potasiu.

Tehnica : frotiurile nefixate sînt acoperite timp de 5 minute cu xilol sau toluol, pentru degresare. Se spală lama bine cu alcool, pentru îndepărtarea toluolului, și se lasă acoperită cu alcool 2—3 minute. Spălare cu apă de robinet, după care se acoperă frotiul cu o soluție *saturată la rece* de bicromat de potasiu în apă distilată și se menține 5—10 minute (mordansare). Spălare cu apă distilată, apoi colorare, timp de 20—30 de minute, cu soluția Giemsa (1 ml colorant la 10 ml apă bidistilată) (adăugarea colorantului se va face încet, picătură cu picătură, mișcînd ușor eprubeta pentru repartizare omogenă, evitînd formarea precipitatelor), spălare la curent de apă, uscare la aer sau cu hîrtie de filtru ; examinare la microscop cu imersie.

Rickettsiile apar colorate în albastru violaceu, uneori bipolar.

Cultivarea rickettsiilor. Rickettsiile patogene fiind, ca și virusurile, paraziți intracelulari, nu se dezvoltă pe medii de cultură lipsite de celule vii, ci numai în celulele anumitor țesuturi ale speciilor receptive, în care multiplicarea lor, ca și a bacteriilor, se face prin diviziune simplă, transversală, precedată de o diviziune a particulelor cromatoide interne.

Primele culturi de rickettsii în condiții de laborator au fost obținute de Wolbach (1923) și A. A. Krontovski, care au demonstrat că *R. prowazeki* și *R. rickettsi* supraviețuiesc și chiar se multiplică în culturi de țesuturi de celule endoteliale după metoda Carrel.

Ulterior, Nigg și Landsteiner (1930) au obținut culturi de rickettsii în fragmente de țesuturi, după metoda Maitland, iar cercetătorul rus Barîkin (1938) și după el, Cox (1941) au făcut primele culturi pe sacul vitelin al embrionului de găină în curs de dezvoltare.

Cunoștințele actuale asupra necesităților de creștere ale rickettsiilor în general sînt destul de limitate comparativ cu alte microorganisme.

Experimental s-a demonstrat că în culturi de țesuturi conținînd celule care se multiplică, rickettsiile cresc mult mai bine la 32°, în timp ce în culturi după metoda Maitland, în care diviziunea mitotică este observată numai rareori, dezvoltarea se face deopotrivă de bine la 32 și 37°. Aceasta concordă cu observațiile asupra infecțiilor experimentale, care au arătat că unele rickettsii, inoculate intraperitoneal la cobai, se dezvoltă mult mai bine în sacul scrotal, unde temperatura este mai mică, decît în cavitatea peritoneală generală. Cercetările lui Pinkerton au adus explicația acestei comportări : rickettsiile se multiplică mai ales în celule care au un metabolism scăzut și de preferință în cele care, deși sînt vii, au încetat să se multiplice activ, spre deosebire de virusuri care se înmulțesc în celulele metabolic active. Datorită acestui fapt, rickettsiile cresc mai bine în culturi la 32° și în sacul scrotal, nu datorită unei preferințe pentru temperaturile mai joase, ci pentru că metabolismul celular este mai puțin intens, la temperaturile respective, decît la 37°.

Respirația rickettsiilor este probabil aerobă, după cum sugerează observațiile lui Burnet, Freeman (1941), care au arătat că rickettsiile cresc numai în regiuni ale membranelor oului embrionat, în care țesutul este aprovizionat abundent cu O_2.

Multiplicarea rickettsiilor este favorizată de o serie de factori, ca : deficiența în riboflavină, iradierea cu raze X, prezența unor cantități foarte mici de fluorură de Na sau KCN, care acționează printr-un mecanism similar (diminuarea metabolismului celular) și este inhibată de prezența acidului paraaminobenzoic, care activează schimburile respiratorii ale celulelor cu care vine în contact.

Cultivarea pe celule aflate în stare de supraviețuire (vii, dar neprofilerante), după metoda Maitland (1928) sau Rivers (1931), folosește fragmente mici de țesuturi în suspensie într-un mediu lichid (soluție Tyrode + ser sanguin + suc embrionar) la pH 7,4—7,8 în care celulelor li se asigură condiții de mediu pentru o supraviețuire de cîteva zile, în timpul cărora servesc ca suport pentru multiplicarea rickettsiilor și virusurilor.

Se folosesc fragmente de embrion de găină de 8—10 zile sau vaginala testiculelor, pericard, mezenter și peritoneu de cobai, care trebuie să formeze în flacon un strat gros de cel mult 2 mm, pentru a asigura o bună oxigenare a culturii.

Rickettsiile se multiplică activ în celulele pe cale de supraviețuire dar neproliferante și la fiecare 3 zile se fac subculturi într-un mediu proaspăt.

Cultivarea în culturi de țesuturi-agar după metoda Zinsser folosește ca suport de cultivare tuburi de geloză înclinată obișnuit, în care mediul nutritiv este înlocuit cu un amestec de ser sanguin de cal + soluție Tyrode. Pe suprafața solidificată se depun fragmente tisulare proaspete (țesut de vaginala testiculului de cobai, embrioni de găină și șoarece) cu suc embrionar și soluție Tyrode.

În aceste condiții, celulele respective, hrănite corespunzător, rămîn vii cîteva săptămîni, în care timp pot fi folosite pentru cultivarea rickettsiilor.

Cultivarea rickettsiilor în culturi monocelulare. În ultimii ani, o dată cu perfecționarea tehnicilor de culturi de țesuturi, această metodă a fost din nou extinsă la studiul diferitelor rickettsii, ca *R. prowazeki*, *R. mooseri*, *R. richettsi R. tsutsugamushi*, *C. burneti*.

Celulele folosite în acest scop au fost : celule endodermice derivate din membrane avasculare recoltate de la embrionul de găină de 4 zile, sau linii celulare din țesuturi normale sau tumorale.

În aceste medii rickettsiile se multiplică în focare de 2—10 celule alăturate, în care *R. tsutsugamushi* crește în arii adiacente nucleului, iar *R. mooseri*, *R. prowazeki* și *C. burneti* se multiplică în toată citoplasma celulelor infectate. În culturile de țesuturi se constată, după multiplicarea rickettsiilor, vacuolizarea accentuată a protoplasmei celulare, îngroșarea rețelei de cromatină, care apare intens colorată, și apariția unui număr mare de celule gigante, cu 4—6 nuclei.

În general, randamentul cultivării rickettsiilor în culturi de țesuturi este mai mic decît cel dat de oul embrionat. Astfel Bozeman, cultivînd *R. tsutsugamushi* în culturi de celule în suspensie în mediu lichid, a observat că în interval de 24 de ore numărul rickettsiilor a crescut numai de 3 ori față de cel inițial, ceea ce corespunde unei viteze mici de diviziune în aceste condiții.

Metoda de cultivare în oul de găină embrionat. Oul embrionat are o serie de avantaje ca mediu de cultură pentru rickettsii şi virusuri, în primul rînd pentru că, spre deosebire de animalul de laborator, embrionul nu prezintă niciodată infecţii naturale latente cu virusuri, iar contaminarea lui accidentală este uşor de evitat. Se adaugă la aceasta incapacitatea embrionului de a produce anticorpi şi reacţii inflamatoare puternice şi lipsa alexinei, care apare în sîngele embrionar numai în momentul ecloziunii, sau cu puţin înainte.

Metoda cultivării virusurilor şi rickettsiilor pe oul embrionat are o serie de aplicaţii practice, ca de exemplu: 1) întreţinerea în laborator a tulpinilor; 2) izolarea primară a acestor agenţi patogeni de la bolnavi sau din diferite produse patologice; 3) producerea de antigene pentru serodiagnostic şi reacţii de hipersensibilitate; 4) studiul acţiunii diferitelor substanţe chimioterapice; 5) producţia de vaccinuri; 6) cercetări de citologie, biologie şi biochimie ale virusurilor şi rickettsiilor.

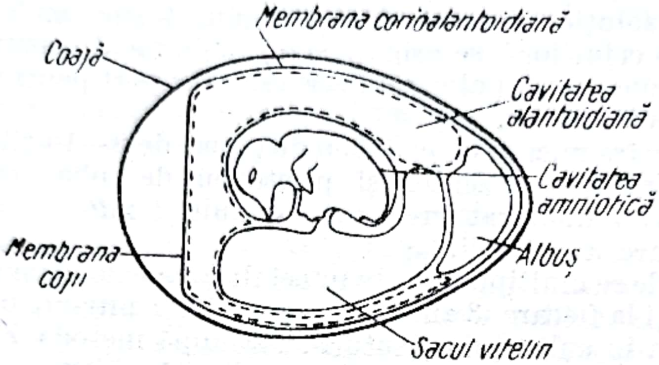


Fig. 155. — Schema oului embrionat.

Incubarea ouălor. Pentru cultivarea virusurilor şi rickettsiilor se folosesc ouă de găină fecundate, proaspete (maximum 5–10 zile de la pontă) şi păstrate la o temperatură de 10–15°. Se recomandă în special folosirea de ouă cu coajă albă, de la găini sănătoase, de rasă Leghorn, provenite din aceeaşi sursă de aprovizionare, pentru a avea o calitate constantă. Ouăle curate sînt puse la incubator, fără a fi spălate în prealabil, cu camera de aer situată în sus, în aşa fel ca axul lor longitudinal să formeze un unghi de 30° cu verticala. Poziţia în care este incubat oul determină localizarea embrionului şi a celorlalte componente din ou. Pentru culturile pe membrana corioalantoidă este avantajos, dar nu indispensabil, ca ouăle să fie incubate culcate (cu axul mare orizontal). În primele 2 zile ouăle vor fi lăsate în aceeaşi poziţie, iar începînd din a treia zi, vor fi întoarse de două ori pe zi, dimineaţa şi seara. Incubarea se va face la 39° (37–39°), asigurînd o aerare satisfăcătoare continuă şi o umiditate relativă de 50–60%.

După 4–5 zile de incubare, ouăle sînt controlate prin transluminare la ovoscop, iar cele care conţin embrioni vii sînt alese pentru inoculare.

Ovoscopia stabileşte vitalitatea embrionului şi stadiul de dezvoltare corespunzător şi permite stabilirea diferitelor repere, ca: limitele camerei cu aer, marcarea punctului de origine al marii vene alantoide, care este cel mai bun reper fix pentru localizarea diferitelor părţi ale embrionului, poziţia embrionului, delimitarea zonei fără vascularizaţie pentru inoculările alantoidiene etc.

Decelarea ouălor nedezvoltate și a embrionilor morți precoce este relativ simplă, spre deosebire de embrionii adulți, la care deseori este greu de stabilit viabilitatea.

În general, mișcările spontane (care sînt mai active la cald, la temperatura incubatorului decît la cea a camerei) și umbra net delimitată a vaselor sanguine sînt cei mai buni indici de vitalitate a embrionului.

Vîrsta embrionilor folosiți pentru culturi este variabilă după natura virusului și după calea de inoculare folosită. În general se folosesc embrioni de 5—7 zile pentru cultivare pe sacul vitelin; 10—12 zile pentru membrana corioalantoidă, 7—11 zile pentru cavitatea alantoidă, 7—14 zile pentru cavitatea amniotică, 8—11 zile pentru inocularea intravenoasă și 8—13 zile pentru inoculările intracerebrale.

Produsele folosite ca inocul trebuie să fie obligatoriu sterile, iar cele care nu îndeplinesc această condiție trebuie debarasate de bacterii.

Cum centrifugarea și filtrarea dau rezultate inconstante, cea mai bună metodă rămîne adăugarea de antibiotice, cu condiția să se țină seamă de sensibilitatea față de ele a microorganismului care urmează să fie cultivat, de natura bacteriilor care trebuie distruse și de toleranța oului pentru antibioticul respectiv.

În mod obișnuit se recomandă adăugarea de penicilină 250—1 000 u./ml, streptomicină 25—100 γ/ml, sulfadiazină 5 mg/ml și inocularea după un contact *in vitro* de 15—30 de minute între antibiotic și produsul de inoculat.

Se recomandă ca diluțiile produsului de cercetat să nu se facă numai în ser fiziologic 0,85% sau bulion simplu. Diluentul cel mai bun este serul sanguin inactivat de cal, diluat 2% în apă distilată sau soluție NaCl 0,85%.

Inocularea pe membrana corioalantoidă este cea mai indicată pentru virusuri (variola, vaccina, herpes), care dau leziuni focale proliferative și evoluează în faza de infecție activă spre zone necrotico-hemoragice, vizibile macroscopic.

Membrana corioalantoidă (m.c.a.) este formată din 3 straturi: extern sau ectodermic, intern, endodermic și intermediar, mezodermic, care conține o rețea bogată de capilare, arteriole, venule și limfatice.

Pentru *inocularea sub observare directă* după metoda Beveridge-Burnet, oul este așezat orizontal și se reperează poziția vaselor — alegînd regiunea unde m.c.a. este cel mai puțin dezvoltată. La acest nivel, după antisepsie cu alcool iodat 1%, se ridică, cu ajutorul unei freze dentare, un capac dreptunghiular de coajă, fără a leza membrana cojii subiacentă. Se perforează punctiform vîrful oului la nivelul camerei cu aer traversînd coaja și membrana cojii; după aceea, cu un ac fin histologic sau cu un ac spatulat se face o perforație foarte fină a membranei cojii, lăsată intactă la nivelul ferestrei. În etapa următoare se creează o cameră de aer artificială deasupra m.c.a. și se suprimă camera de aer naturală. În acest scop se aspiră cu o tetină aerul din camera cu aer, ceea ce determină o coborîre a m.c.a., după îndepărtarea membranei cojii; pornind de la perforația făcută anterior, de jur împrejurul ferestrei create, apare m.c.a., pe suprafața căreia se poate face inocularea, fie depunînd un fragment fin de țesut infectat, fie o picătură de suspensie cu ajutorul unei seringi fine sau al unei pipete Pasteur, calibrate la 0,05 ml/picătură.

După însămînţare, fereastra este acoperită cu o bucată de celofan adeziv steril, sau cu o lamelă fixată cu parafină caldă. Incubarea se face în continuare în poziţie orizontală la 37° pentru virusuri, sau la 32–34° pentru rickettsii.

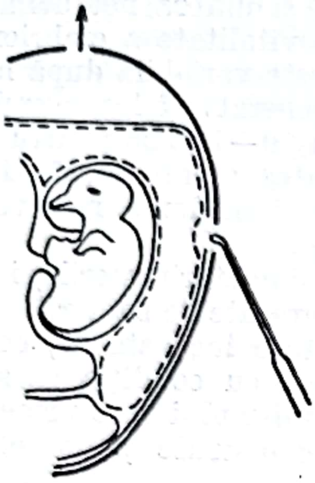


Fig. 156. — Inoculare pe membrana corioalantoidă.

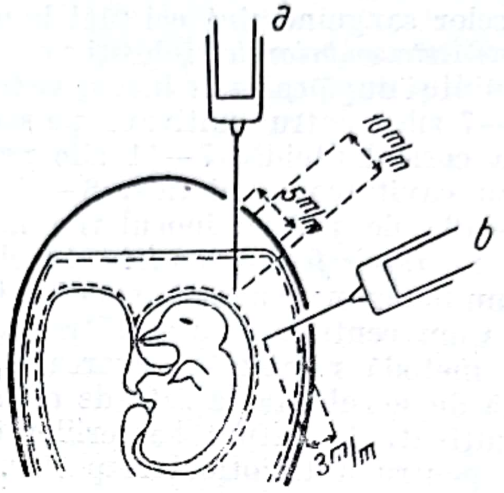


Fig. 157. — Inoculare în cavitatea alantoidiană

a şi *b* – căi de acces

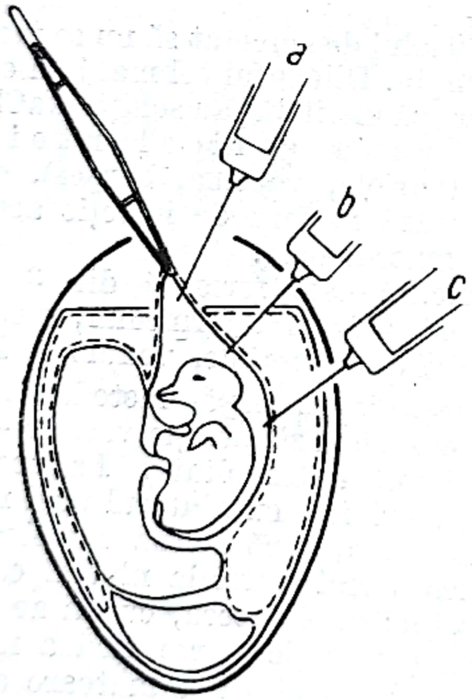


Fig. 158. — Inoculare în cavitatea amniotică :

a, b, c – căi de acces

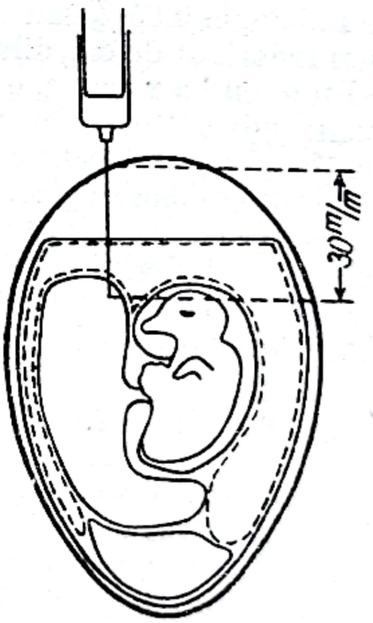


Fig. 159. — Inoculare în sacul vitelin.

Observarea stării embrionului şi a dezvoltării leziunilor se face prin fereastra cojii la lumină directă. Leziunile ajung la maximum după 48–96 de ore şi, în cazurile în care devin extensive, determină moartea embrionului.

Inocularea în cavitatea alantoidiană. Cavitatea alantoidiană (c.a.) este un spaţiu închis, determinat de membrana corioalantoidă, mărginit de celule epiteliale ectodermice, îi serveşte ca depozit pentru excretele renale ale embrionului. Conţine un lichid format dintr-o secreţie a celulelor endodermice care delimitează cavitatea, la care se adaugă constant excretele renale ale embrionului şi al cărui volum creşte rapid, de la 1 ml, în ziua a şaptea de incubare, la 5–10 ml în ziua a 13-a.

Inocularea în c.a. este preferată cînd este nevoie de cantităţi relativ mari de virus, în special pentru prepararea de antigene şi vaccinuri.

Abordarea ei se poate face pe două căi:

a) printr-un orificiu în coajă situat la 0,5 cm de baza camerei de aer, introducînd acul vertical prin camera de aer circa 10–14 mm la suprafaţa cojii şi inoculînd 0,05–0,2 ml;

b) se reperează o regiune nevascularizată situată pe unul din marile diametre ale oului, la 2–3 cm sub baza camerei cu aer, şi se perforează coaja punctiform, fără a leza membrana cojii.

Se injectează 0,05–0,2 ml cu ajutorul unui ac cu bizou scurt, introdus 3–4 mm.

Inocularea în cavitatea amniotică. Amniosul, care este o proliferare a somatopleurei ventrale, acoperă complet embrionul, cu excepţia sacului vitelin, începînd din ziua a cincea. Embrionul este scufundat complet în lichidul amniotic care umple cavitatea (sacul) amniotică (c.a.m.). Introducerea unui agent infecţios în lichidul amniotic expune la infecţie celulele epiteliale ale stratului intern al amniosului, precum şi epiteliul epidermic al embrionului. În plus, la embrionii de peste 12 zile mişcările respiratorii şi cele de deglutiţie determină pătrunderea agentului patogen în epiteliul bucal, nazo-faringian, trahee, bronhii, esofag şi părţile superioare ale tractului gastro-intestinal prin intermediul cărora procesul infecţios se poate extinde la tot embrionul.

Inocularea în c.a.m. cu vizibilitate directă are avantajul că permite urmărirea traseului acului şi inocularea sigură în cavitate. În acest scop se decupează o fereastră rotundă, cu diametrul de 2 cm, la nivelul camerei cu aer, prin care se deschide membrana cojii, şi apoi m.c.a., iar prin breşa creată se apucă sacul amniotic, în care se inoculează cu o pipetă sau un ac fin. După închiderea ferestrei cojii, oul este incubat vertical.

Pentru inocularea fără vizualizare directă se folosesc ouă cu embrioni uşor reperabili prin transluminarea la ovoscop, în cameră obscură.

După reperarea camerei cu aer şi a ochiului embrionului, se introduce acul prin camera cu aer sau printr-o gaură laterală, în direcţia embrionului. pînă cînd îl întîlneşte. Proba contactului între ac şi embrion este făcută, fie de o mişcare bruscă de retragere a embrionului, fie de o senzaţie particulară de rezistenţă. În acest moment se retrage acul puţin şi se inoculează 0,1–0,2 ml inocul, traversînd m.c.a., evitînd dilacerarea ei şi apucarea amniosului cu pensa. Orificiul este acoperit cu parafină sau celofan adeziv.

Inocularea în sacul vitelin. Sacul vitelin (s.v.) se dezvoltă din splahno-pleura extraembrionară, ca o continuare a intestinului embrionului şi este, ca apariţie, cea mai primitivă membrană extraembrionară. Creşterea lui este extrem de rapidă, în aşa fel încît în ziua a şasea include întreg gălbenuşul oului.

Sacul vitelin funcționează ca un organ formator de sînge și participă în absorbția substanțelor hrănitoare din gălbenuș și transportul lor la embrion.

Inocularea în sacul vitelin se face după perforarea cojii, cu ajutorul unei freze dentare, făcînd un orificiu de 1—2 mm în centrul camerei cu aer, după badijonare cu alcool iodat.

Inocularea se face cu un ac lung de 4—5 cm, gros de 5—7 mm, cu bizou scurt, introdus vertical 2,5—3 cm în profunzime, de la suprafața cojii. Se inoculează 0,2—0,5 ml, după care orificiul de puncție este acoperit cu parafină. Incubarea se face în continuare la 34—37°.

Temperaturile mai joase (34°,5) sînt în special potrivite pentru cultivarea rickettsiilor, deoarece încetinesc dezvoltarea embrionului și creează condiții mai bune pentru dezvoltarea agentului patogen. Ouăle inoculate sînt controlate zilnic la ovoscop, iar embrionii morți în primele 24—48 de ore după inoculare sînt îndepărtați. Recoltarea sacilor vitelini se face a patra, a șasea zi, imediat după moartea embrionilor, sau cînd mișcările lor devin lente și apar tulburări de circulație, manifestate prin revărsări de sînge. În acest scop, ouăle sînt așezate cu camera de aer în sus și după badijonarea regiunii cu alcool iodat, se îndepărtează coaja de jur împrejurul acestei camere, se îndepărtează membrana cojii și m.c.a., după care conținutul oului este răsturnat, cu precauții de sterilitate, într-o placă Petri. Sacul vitelin este detașat de embrion cu ajutorul unei pense sterile și după scurgerea excesului de lichid vitelin se fac frotiuri, folosind mici fragmente de țesut vitelin recoltate cît mai aproape de pedicul, dintr-o zonă fără vilozități.

Rickettsiile patogene pentru om, cu excepția *R. wolhynica*, se dezvoltă foarte bine pe sacul vitelin. În cazul izolărilor de la bolnavi sau din diferite alte produse adaptarea se realizează uneori cu oarecare dificultate, necesitînd cîteva treceri negative (oarbe). Tulpinile adaptate se dezvoltă însă foarte bine, putînd da pînă la 10^8-10^{11} rickettsii pe gram de țesut vitelin și pot fi întreținute timp îndelungat în laborator prin subculturi.

Inocularea intravenoasă nu are aplicabilitate practică foarte mare, în schimb este foarte importantă pentru cercetări privind diseminarea agentului patogen pe cale sanguină și patogenia infecției respective. Se face ridicînd o fereastră din coajă după reperarea unei vene mari și drepte. Se depune o picătură de ulei de vaselină steril, pentru a face membrana cojii transparentă după care se determină direcția curentului sanguin. Se injectează foarte lent, 0,05—0,2 ml în direcția curentului sanguin.

Inocularea intracerebrală, recomandabilă pentru unele virusuri ca virusul rabic, herpes ș.a., se face după aceeași tehnică indicată pentru inocularea amniotică cu vizibilitate directă, respectiv se reperează capul embrionului, care este făcut cît mai accesibil prin mișcarea oului. După evidențierea lui, prin fereastra creată în coajă, embrionul este menținut cu o pensă sterilă fină de cioc sau de pleoapă, introdusă printr-o deschizătură fină a membranei corioalantoide.

Cu ajutorul unei mișcări bruște se introduce acul în creierul embrionului, aproximativ 2 mm, și se inoculează 0,02—0,05 ml inocul.

Structura antigenică a rickettsiilor

Cunoaşterea structurii antigenice a rickettsiilor şi prepararea antigenelor pentru diagnosticul serologic specific au fost posibile după obţinerea unor culturi abundente pe oul embrionat sau plămîn de şoarece.

În principiu, este necesară concentrarea rickettsiilor din produsul respectiv şi debarasarea de resturile celulare şi substanţele străine, fapt care se realizează în general prin centrifugare fracţionată şi tratare cu eter.

În acest scop, sacii vitelini, care conţin cantităţi mari de rickettsii, după triturare în *Waring-blendor* sînt suspendaţi în ser fiziologic (NaCl 0,85%), în proporţie de 10 ml/sac, formolat 0,4% şi amestecaţi într-o pîlnie de separaţie cu o cantitate egală sau dublă de eter sulfuric. După agitare viguroasă de mai multe ori şi repaus de 24 de ore la temperatura camerei, sub influenţa eterului se formează 3 straturi suprapuse:

1) stratul superior, conţinînd excesul de eter în care s-au dizolvat grăsimile eterosolubile; 2) stratul mijlociu — interfaza — conţinînd fragmente de ţesuturi şi particule de ţesut vitelin; 3) stratul inferior — faza apoasă — care conţine, în afară de o cantitate foarte mică de particule din ţesutul infectat, rickettsii în suspensie şi o cantitate mare de antigen solubil. Deci, după tratarea cu eter, concentrarea rickettsiilor se face în faza apoasă, cu excepţia *R. orientalis*, care este reţinută în stratul mijlociu.

Prin centrifugarea fazei apoase la turaţii mari (o oră la 10 000—18 000 t/min.) se pot separa cele două componente antigenice, corpuscular şi solubil ale rickettsiilor.

Antigenele corpusculare reprezintă o suspensie de corpi rickettsieni, purificată de elementele tisulare şi substanţe proteice. În cazurile în care rickettsiile sînt spălate prin centrifugări repetate, se pot obţine antigene cu specificitate de tip, care pot diferenţia în reacţiile serologice, chiar două infecţii foarte înrudite, făcînd parte din acelaşi grup de clasificare, ca de exemplu tifosul exantematic şi tifosul murin.

Antigenele solubile sînt substanţe serologic active, neinfecţioase, care pot fi separate de celula rickettsiană prin filtrare prin filtre bacteriene sau centrifugări prelungite. În aceste cazuri, antigenele solubile (AS) sînt găsite în filtrat şi, respectiv, în supernatant. Prezenţa AS la rickettsii a fost demonstrată în 1942 (Smadel), cînd s-a arătat că tratarea cu eter a suspensiilor rickettsiene favorizează mult liberarea lor în mediu. Microscopia electronică a probat că AS rickettsian este format din fragmente inframicroscopice, provenite din desprinderea şi sfărîmarea stratului periferic, capsular, al celulei rickettsiene, iar originea rickettsiană a acestor fragmente a fost probată prin aglutinarea lor cu antiserul specific.

Antigenele solubile rickettsiene au capacitate imunogenă şi conferă protecţia cobaiului faţă de o inoculare de probă, stimulează apariţia de anticorpi şi pot fi folosite *in vitro* ca antigen în reacţia de fixare a complementului şi reacţiile de precipitare.

Antigenele solubile sînt dotate cu specificitate de grup. Ele pot fi folosite, spre exemplu, pentru a diferenţia o infecţie din grupul tifos epidemic murin de cele din grupul febrei pătate, dar nu permit identificarea bolilor produse de rickettsii care au antigene comune. Astfel, AS ale *R. prowazekii* şi *R. mooseri* sînt practic nedeosebite; de aceea, cînd sînt folosite în teste serologice nu fac deosebirea între infecţiile provocate de cei doi agenţi patogeni. La fel, AS prezent la *R. rickettsii* este comun cu al celorlalte rickettsii din grupul febrelor pătate, *R. akari* şi *R. conorii*.

Pentru serodiagnosticul rickettsiozelor se pot folosi antigene corpusculare, antigene solubile sau antigene „totale” (solubile + corpusculare).

Toxicitatea rickettsiilor. Gildemeister şi Haagen (1940) au arătat că şoarecii inoculaţi intraperitoneal cu o suspensie bogată de *R. mooseri*, din culturi pe sacul vitelin, mor în 4—20 de ore.

Rezultate similare au fost obţinute de alţi autori pentru *R. prowazeki*, *R. rickettsi*, *R. orientalis* şi *R. conori*. Moartea rapidă a animalelor arată că acest efect este datorit unei toxine, şi nu infecţiei cu aceste rickettsii. O dovadă în plus o constituie faptul că animalele care nu sucombă în cîteva ore din cauza efectului toxic rămîn după aceea sănătoase timp de cîteva zile, după care fac semnele obişnuite de infecţie şi mor.

Efectul toxic al rickettsiilor este demonstrabil numai în prezenţa unei suspensii foarte concentrate de agenţi patogeni vii şi aproape totdeauna numai pentru culturi în sacul vitelin. În anumite condiţii, pentru a produce efectul toxic letal la şoarece după injecţia intravenoasă, sînt necesare între 1 şi 10 milioane celule de *R. prowazeki* vii şi peste 100 milioane *R. rickettsi*. Încercările de a separa efectul toxic de particula infecţioasă nu au dat rezultate, deoarece toxina rickettsiană este extrem de labilă şi este rapid inactivată. Toxina rickettsiană poate fi păstrată prin conservarea suspensiei de rickettsii la temperaturi sub 60° şi este distrusă prin încălzire la 56° sau adăugare de eter.

Adăugarea de formol 0,3—0,4% distruge capacitatea letală a suspensiei, dar îi păstrează imunogenitatea. Produsul astfel obţinut, netoxic şi neinfecţios, este foarte stabil; inoculat la om şi animale, determină formarea de anticorpi antitoxici care protejează în mod specific faţă de actiunea toxinei respective.

Toxicitatea rickettsiilor se manifestă cel mai bine la şoarece după inocularea intraperitoneală sau mai ales intravenoasă. Animalele rămîn sănătoase 1—2 ore de la inoculare după care prezintă slăbiciune, dispnee, păr zbîrlit, prostraţie şi convulsii, care duc obişnuit la moarte în 3—4 ore, maximum 18 ore de la inoculare. Cauza directă a morţii animalelor este o stază capilară difuză în creier (Avtîn). Efecte similare s-au obţinut şi la şobolan şi iepure, folosind însă doze diferite de rickettsii.

Nu se cunosc decît puţine date în legătură cu natura toxinei rickettsiene şi asupra importanţei ei în patogenia bolilor respective.

În plus, unele rickettsii, ca de pildă *R. prowazeki*, conţin un factor endotoxic (leucopenic, hipotermic şi hipoglicemiant) imunologic înrudit cu cel al bacteriilor Gram-negative (Olitzki), diferit de toxina letală şi a cărui participare în evoluţia clinică a rickettsiozelor este de asemenea puţin cunoscută.

Datorită lipsei de analogie cu toxinele propriu-zise (exo- şi endotoxinele bacteriene) este de preferat să se folosească termenii de toxicitate a rickettsiilor sau de efect toxic al rickettsiilor în locul celor uzuali de toxină şi toxemie.

Acţiunea hemolitică a rickettsiilor: suspensiile bogate de *R. prowazekii*, *R. mooseri* şi *R. rickettsi* vii, hemolizează *in vitro* eritrocitele mai multor specii de mamifere. Nu s-a putut separa pînă în prezent o hemolizină rickettsiană.

Acțiunea hemolitică a rickettsiilor este neutralizată prin serul imun respectiv.

Imunitatea în rickettsioze

Cercetările lui Zdrodovski și colaboratorii au arătat că imunitatea antirickettsiană este determinată de 2 componente (antitoxică și antiinfecțioasă), independente una de cealaltă.

Imunitatea antitoxică este evidențiată de capacitatea serului de convalescent de a neutraliza efectul unei doze mortale de toxină inoculată intravenos la șoarece, după un contact prealabil *in vitro* cu serul respectiv.

Puterea antitoxică a serului se măsoară în unități antitoxice (UA), o unitate antitoxică fiind cantitatea de antitoxină capabilă să neutralizeze $2DL_{50}$ toxină rickettsiană (DL_{50} toxină rickettsiană = cantitatea minimă de toxină care omoară în 24 de ore 50% din șoarecii inoculați).

Componenta antiinfecțioasă a imunității antirickettsiene este independentă de prima.

După datele clasice, se consideră că imunitatea dobîndită în rickettsioze, ca rezultat al trecerii prin boală, este foarte solidă și de lungă durată, de cele mai multe ori pentru tot restul vieții.

Datele acumulate în ultimele 2 decenii au arătat însă că imunitatea în rickettsioze nu este nici absolută, nici definitivă; după o perioadă variabilă de timp pot apărea reîmbolnăviri.

Natura imunității în rickettsioze. Rickettsiile pot persista mult timp după infecția inițială în gazele lor naturale sau de laborator, în ciuda prezenței anticorpilor, uneori la un titru destul de ridicat.

Astfel *R. prowazeki* a fost găsită în organele cobailor infectați și după 60 de zile de la infectarea experimentală (Krasnic), iar în sînge, după 17 zile de la apirexie (Combiescu și colaboratorii).

R. mooseri persistă în creier la șobolanul alb 370 de zile după infecție, *C. burneti* de la 180 de zile pînă la 560 de zile (Combiescu și colaboratorii), iar *R. tsutsugamushi* a fost izolată din sîngele și splina cobailor după 635 de zile de la trecerea prin boală.

Rezultatele asupra persistenței rickettsiilor la om după infecție, deși mai puțin numeroase, pledează deopotrivă în același sens.

W. H. Price a izolat *R. prowazeki* din ganglionii limfatici a doi foști bolnavi de tifos exantematic, după 20 de ani de la infecție, prin menținerea fragmentelor de ganglioni recoltate cu ocazia unor intervenții chirurgicale într-un mediu pentru culturi de țesuturi, urmată de inocularea lor la un animal foarte receptiv, șobolanul de bumbac.

În mod similar au fost izolate rickettsii din ganglionii limfatici după 12 luni de la apirexie, de la un caz de febră pătată a Munților Stîncoși și după 6—12 luni, de la foști bolnavi de febră tsutsugamushi.

Această persistență îndelungată a rickettsiilor în organismul foștilor bolnavi și unele fapte de observație epidemiologică privind reîmbolnăvirile în tifosul exantematic au determinat pe unii cercetători să încadreze rickettsiozele în categoria bolilor premunizante, la care după perioada de stare a bolii se instalează o stare de infecţie cronică latentă, care asigură protecţia faţă de reinfecţiile ulterioare.

Date generale asupra premuniţiei. În 1924, Sergent, împreună cu Parrot şi Donatien, bazaţi pe cercetările efectuate în paludism, piroplasmoze, tripanosomiaze, bruceloză, spirochetoze etc. au propus termenul de premuniţie pentru a defini acest tip particular de imunitate, condiţionat de o infecţie latentă.

Caracteristicile stării de premuniţie. După Sergent, ca mecanism, imunitatea adevărată şi premuniţia au acelaşi substrat, numai că, în bolile cu imunitate adevărată există o incompatibilitate între viaţa microorganismului invadant şi organismul atacat (microorganismul omoară sau este omorît), pe cînd în premuniţie această convieţuire este posibilă.

Starea de premuniţie prezintă totuşi o serie de caracteristici care o diferenţiază de celelalte tipuri de imunitate. Dintre acestea cităm următoarele :

1. Vindecarea fostului bolnav este numai clinică, deoarece la sfîrşitul bolii se instalează o stare de infecţie cronică latentă, în care agentul patogen supravieţuieşte în ţesuturi. În această perioadă organismul prezintă o toleranţă completă faţă de virusul respectiv, care produce o infecţie cronică latentă, în absenţa fenomenelor morbide.

2. Prezenţa permanentă a agentului patogen în ţesuturi realizează în organism o antigenoterapie permanentă, care menţine forţele de apărare într-o stare de alarmă specială. Ca urmare, atît primoinfecţia, rămasă latentă, cît şi suprainfecţiile ulterioare sînt împiedicate să evolueze. În cazul unei reinfecţii, agentul patogen respectiv nu se supraadaugă, ca şi cînd organismul-gazdă, menţinut în stare de alarmă de germenul latent, respinge acesată invazie secundară, locul rămînînd primului ocupant. Este ceea ce Sergent a numit, în 1934, *loi de la préséance*, iar Pampana, *legge di precedenza*.

3. Starea de imunitate astfel dobîndită dispare în momentul în care infecţia latentă dispare, spontan sau în urma tratamentului, organismul redobîndindu-şi receptivitatea iniţială.

Dacă în această perioadă, după dispariţia premuniţiei, persoana sau animalul respectiv este reinfectat cu acelaşi agent patogen, el reproduce o nouă boală, o *recidivă* a infecţiei.

Recidiva reprezintă, prin urmare, o nouă îmbolnăvire a unei persoane care a suferit deja de aceeaşi boală, dar de care era complet vindecată în momentul reinfecţiei. Recidivele presupun o nouă infecţie, iar în bolile cu premuniţie ele apar după dispariţia stării de infecţie latentă care condiţiona premuniţia.

4. Deşi este ştiut că orice tip de imunitate poate fi forţat, trebuie insistat asupra faptului că în timp ce imunitatea adevărată nu este totdeauna absolută, premuniţia este totdeauna relativă. În funcţie de virulenţa agentului patogen sau de doză, reinoculările pot fi urmate de reîmbolnăviri.

Imunitatea prin premuniţie este relativă, deoarece agentul care persistă latent se poate redeştepta subit, generînd *recăderi* şi, în al doilea rînd, deoarece în momentul în care infecţia latentă încetează, ca urmare a sterilizării organismului, acesta redevine sensibil.

5. În determinismul stării refractare astfel obținute, un rol important revine sistemului reticulo-endotelial (S.R.E.). Bolile cu premuniție se însoțesc în general de o hiperplazie a S.R.E. (hepato-splenomegalie, adenopatii), care traduc efortul permanent al organismului de a stăpîni infecția latentă.

6. Sub influența anumitor factori care modifică echilibrul dintre micro- și macroorganism, infecția latentă poate deveni activă; agentul patogen începe să se multiplice, rezultatul fiind instalarea unei *recăderi* a bolii inițiale.

Recăderea, după această concepție, poate fi definită ca fiind reapariția unui acces acut în cursul unei infecții latente consecutive unui acces de primoinfecție.

Recăderea poate fi completă (clinică și bacteriologică), sau numai bacteriologică (trecerea agentului patogen în sînge spre exemplu), fără nici o manifestare clinică. Recăderile pur parazitare (bacteriologice) nu sînt nocive pentru individ, dar sînt periculoase pentru colectivitate, deoarece în timpul lor organismul respectiv este infectant pentru vectori.

Nu se cunoaște în prezent care este mecanismul prin care rickettsiile pot persista în organismul foștilor bolnavi în prezența anticorpilor, fără a fi influențate de aceștia în ceea ce privește capacitatea lor de multiplicare și de infectare a unor celule noi.

Din punct de vedere imunologic și epidemiologic premuniția prezintă o serie de inconveniente:

— sfîrșitul stării de premuniție (sterilizarea de infecția latentă) aduce după sine receptivitatea la infecție;

— infecția latentă se poate redeștepta sub formă de recăderi ori de cîte ori echilibrul dintre micro- și macroorganism este alterat; spre exemplu, prin slăbirea forțelor de apărare ale organismului;

— rezistența conferită de premuniție nu are raport cu vechimea infecției și nu este întărită prin reinoculări repetate;

— recăderile pot acționa ca izvor de infecție și ca punct de plecare, adesea necunoscut, pentru epidemii și epizootii.

Profilaxia specifică a bolilor preimunizante poate fi realizată numai cu vaccinuri vii, cele omorîte fiind neeficace. Se folosesc în mod obișnuit vaccinuri cu germeni vii, dar suficient de virulenți pentru a supraviețui și a se multiplica un timp în organismul vaccinat.

Diagnosticul de laborator al rickettsiozelor

Izolarea rickettsiilor de la om și animalele bolnave sau din organismul artropodelor vectoare se practică numai în laboratoare special amenajate.

Însă primele etape ale acestui proces, inocularea produselor patologice la animale de laborator și urmărirea acestora se pot face în orice laborator de bacteriologie, fără un risc deosebit, urmînd ca pentru izolarea și identificarea agentului patogen, animalele să fie trimise unui laborator de specialitate.

Produsele patologice folosite sînt:

a) Sîngele de bolnav: poate fi folosit pentru izolarea rickettsiilor mai ales în ziua a patra—a cincea de boală.

Animalele pot fi inoculate direct, la patul bolnavilor, cu sînge total necoagulat, imediat după recoltare. De asemenea dacă se poate asigura transportul rapid la laborator în 1/2—1 oră se va injecta sînge defibrinat sau heparinizat.

Cînd recoltarea sîngelui se face mai tardiv, se va inocula la cobai numai sedimentul globular obţinut prin centrifugare sau cheagul sanguin mojarat şi diluat în ser fiziologic, după îndepărtarea plasmei (respectiv a serului), care conţine anticorpi neutralizanţi şi ar putea împiedica dezvoltarea rickettsiilor.

b) Produsele patologice, bacteriologic nesterile, ca de exemplu laptele, fragmentele de placentă sau ţesuturi fetale, filtrat de dejecţii, urină etc., folosite în special în cazul febrei Q, vor fi inoculate la cobai după adăugarea de penicilină (1 000—5 000 u./ml) şi în contact *in vitro*, 20—30 de minute. Nu este recomandabilă folosirea streptomicinei sau a altor antibiotice cu spectru larg, care ar putea avea efect rickettsiostatic.

Izolarea de la artropode se face după o prealabilă dezinfectare a acestora într-o baie de eter în placă Petri, urmată de 2—3 spălări succesive în apă distilată sau fiziologică, pentru a reduce numărul bacteriilor contaminante externe. Se triturează în mojar loturi de 10—25—50 de exemplare şi se suspendă în 10—15 ml soluţie salină fiziologică, din care se inoculează 1—3 ml intraperitoneal la cobai.

Se recomandă folosirea de artropode vii, evitînd desicaţia, inaniţia şi expunerea lor la temperaturi extreme.

Izolarea prin inoculare la animale de laborator. Animalele de laborator folosite pentru izolarea rickettsiilor sînt cobaii masculi adulţi şi şoarecele alb. Embrionul de găină, care permite o dezvoltare abundentă a rickettsiilor adaptate la om, nu este potrivit ca gazdă pentru izolările directe de la bolnavi sau artropode.

Inocularea la cobai. Se folosesc de obicei 2 cobai masculi normali, în greutate de 400—500 g, controlaţi prin termometrizarea timp de 10 zile înainte de inoculare, la care se inoculează 4—5 ml sînge intraperitoneal. După 2 zile de la inoculare, în care timp cobaii pot face o febră nespecifică, datorită resorbţiei de substanţe nespecifiice, de la locul de inoculare, animalele sînt termometrizate zilnic dimineaţa şi seara, în general la ore fixe, datorită variaţiilor diurne posibile ale temperaturii.

Controlul temperaturii se face rectal, iar termometrul se dezinfectează după fiecare animal.

Infecţia rickettsiană a cobaiului evoluează aproape invariabil ca o reacţie febrilă, cu mici oscilaţii în jur de 40—41°, care apare după o perioadă de incubaţie variabilă, obişnuit mai lungă în cazul izolării rickettsiilor de la bolnav, şi mai scurtă în cazul tulpinilor adaptate.

Sînt socotite ca o reacţie febrilă temperaturile care depăşesc 39°,5. La sfîrşitul perioadei febrile, animalele infectate cu *R. prowazeki* şi *R. mooseri* se vindecă complet, în timp ce în cazul infecţiei cu *R. rickettsi*, şi chiar cu unele tulpini de *C. burneti*, un mare număr de animale mor. Pentru identificarea preliminară a agentului patogen se cercetează :

1. Aspectul regiunii scrotale, care la cobaii masculi poate prezenta un aspect normal (tifos exantematic, febra Q), o reacţie scrotală cu eritem şi edem (tifos murin, febră butonoasă), sau o reacţie intensă cu pete hemoragice, necroză şi ulceraţii (febra pătată).

2. Aspectul *post mortem* al cobaiului infectat sacrificat, care poate arăta prezența unei peritonite ușoare, a reacției scrotale sau prezența unei pelicule subțiri de exsudat fibrinos pe suprafața splinei și a ficatului.

3. Examenul microscopic al frotiurilor făcute cu amprente de splină, peritoneu sau tunica vaginală a testiculului, colorate cu colorația Giemsa sau Macchiavello.

Pentru a aproba etiologia rickettsiană a infecției și a determina tipul agentului infectant, se va recurge la o serie de probe suplimentare, care pot confirma natura bolii respective, și anume :

1. Infecția rickettsiană a cobaiului este transmisibilă în serie la alte animale sănătoase. Organele infectate ale cobaiului, sacrificat în perioada febrilă, triturate într-un mojar și suspendate în ser fiziologic (NaCl 0,85%), inoculate în general intraperitoneal la alți cobai normali, transmit o infecție cu același caracter.

Pentru aceste treceri se vor folosi creier (tifos exantematic), vaginala testiculului (tifos murin, febră butonoasă), splină, suprarenală, creier (febra Q) etc.

2. În sîngele animalelor apar anticorpi, care pot fi evidențiați după circa 28 de zile de la apirexie, prin reacția de fixare a complementului cu un antigen rickettsian standard.

3. Animalele infectate experimental cu o tulpină de rickettsia rămîn imune față de reinfecție cu o tulpină de colecție aparținînd speciei omologe. Proba de imunitate se practică după 21—30 de zile de la apirexie, inoculîndu-se în paralel și un lot de cobai martori cu tulpina cunoscută de rickettsii. Dacă cobaii de cercetat fac o reacție febrilă asemănătoare cu cea a martorilor, înseamnă că prima infecție nu le-a conferit imunitate față de inocularea de probă și că deci a avut o altă etiologie decît cea rickettsiană.

4. Punerea în evidență a modificărilor histopatologice specifice în organele lezate (de exemplu, leziunile de endo- și perivascularită, tip nodulii Popov-Fraenkel, la cobaii infectați cu tifos exantematic, în creier, cerebel, măduvă).

5. Izolarea rickettsiilor de la animalele infectate :

a) prin inoculare la păduche, prin clismă intraanală sau pe cale naturală, hrănindu-i prin epidermo-membrane cu sînge sau suspensii de creier. După a șaptea — a opta zi de la infectare, păduchii încep să moară, iar la examenul microscopic, în celulele lor stomacale care apar foarte mult mărite de volum și proeminînd spre cavitatea digestivă, se observă numeroase rickettsii ;

b) prin inoculare a cîte 0,5 ml sînge defibrinat (recoltat de la cobaiul infectat în perioada febrilă) în sacul vitelin, la 4—6 ouă embrionate, de 6—7 zile. Se obțin după cîteva subtreceri, uneori oarbe, culturi abundente de rickettsii, vizibile pe frotiuri la microscop.

6. Din culturile pe sac vitelin astfel obținute se va prepara un antigen, care va reacționa specific în reacția de fixare a complementului (RFC), RAR sau alte teste serologice, atît cu un ser antirickettsian cunoscut de referință cît și cu serul respectiv de convalescent.

Inocularea la șoarece. Izolarea rickettsiilor de la bolnav sau din alte produse infectate se face prin inoculare intraperitoneală la șoarece.

Unele rickettsii (*C. burneti*, *R. prowazeki*, *R. mooseri*) inoculate pe această cale dau cel mult cîteva semne minime de boală. În general prezența unei cantități cît de mici de lichid peritoneal, ca și a unei splenomegalii chiar moderate trebuie să creeze o suspiciune de infecție rickettsiană și necesită cercetări în continuare (treceri la alți șoareci normali și alte animale de laborator), pentru precizarea diagnosticului.

În cazul *R. tsutsugamushi* și *R. akari*, șoarecii fac după o incubație variabilă o stare de boală exteriorizată prin inapetență, zbîrlirea părului, fotofobie, inactivitate și uneori sfîrșit letal, iar la necropsie cu splenomegalie, lichid peritoneal și pleural, edem, congestie etc.

Identificarea agentului patogen se face, în linii mari, după aceleași criterii ca în cazul infecției la cobai.

Diagnosticul serologic al rickettsiozelor

Diagnosticul serologic al rickettsiozelor se poate face cu ajutorul metodelor specifice de diagnostic, care folosesc antigenele rickettsiene, ca RFC, RAR ș.a., sau cu ajutorul reacțiilor nespecifice, de paraaglutinare, tip reacția Weil-Felix, care folosesc proprietatea serurilor de convalescent de a aglutina o suspensie de Proteus OX 19, OX 2 sau OXK.

În general, pentru stabilirea unui diagnostic precis este de preferat folosirea metodelor specifice și urmărirea evoluției titrului la bolnavi pe 3 probe, recoltate în diferite perioade ale bolii, și anume, de preferință : 1) în primele zile de boală ; 2) în cursul săptămînii a doua și 3) în cursul săptămînii a patra de la debut.

1. **Metode specifice de diagnostic.** Metodele specifice de diagnostic, folosind antigene rickettsiene, au fost aplicate în special după ce s-au putut obține culturi bogate de rickettsii, fie pe oul embrionat după metoda Cox, fie pe plămînul de șoarece.

Reacția Smorodințev-Fradkina. Aplicabilă la diagnosticul rickettsiozelor, al căror agent patogen are o fracțiune antigenică solubilă, se bazează pe posibilitatea de a evidenția acest antigen în serul bolnavilor, în primele 3—4 zile de boală, adică înainte de apariția anticorpilor respectivi.

Reacția se face prin aglutinarea pe lamă a unei suspensii de carmin, pe care a fost adsorbit antigenul rickettsian, cu ajutorul unei alte suspensii de carmin, încărcate cu anticorpii respectivi, proveniți dintr-un ser sigur de convalescent. În cazul reacțiilor pozitive, combinarea dintre antigen și anticorp antrenează și particulele respective de carmin pe care sînt adsorbite, ceea ce face reacția vizibilă macroscopic. Reacția este utilă pentru că permite diagnosticul precoce al cazurilor în faza preeruptivă a bolii asigurînd astfel posibilitatea unei izolări precoce a bolnavilor.

Reacția de fixare a complementului (RFC). RFC cu antigene rickettsiene este metoda cea mai răspîndită de diagnostic și este aplicabilă în toate rickettsiozele, cu excepția febrei de tranșee.

Pentru cercetările de teren, și în special în regiunile unde este prevalentă o anumită rickettsioză, se folosesc antigene cu specificitate de grup.

Pentru diferențieri precise între infecții strîns înrudite se vor folosi antigene purificate cu specificitate de tip (antigen corpuscular).

Tehnica reacției de fixare a complementului. *Titrarea alexinei.* Material necesar : 1) alexină ; 2) hemolizină cu titrul cunoscut, diluată (0,2 ml = 2 u. hemolitice) ; 3) hematii de oaie proaspete, spălate ; 4) antigen rickettsian utilizat în reacție, titrat și diluat 0,2 ml = 4 u. antigen); 5) ser fiziologic (NaCl 0,85%) steril; 6) micropipetă; 7) stelaj, eprubete de hemoliză, pipete, termostat de 37°.

Titrarea alexinei se face obligatoriu în fiecare zi de lucru, utilizînd alexină diluată 1/40, după cum urmează: 0,1 ml alexină (la care s-a adăugat soluţie saturată NaCl) + 0,3 ml apă distilată (pentru izotonizare) + + 3,6 ml soluţie apoasă NaCl 0,85%. Schema reacţiei de titrare a alexinei este redată în tabelul LXXXV.

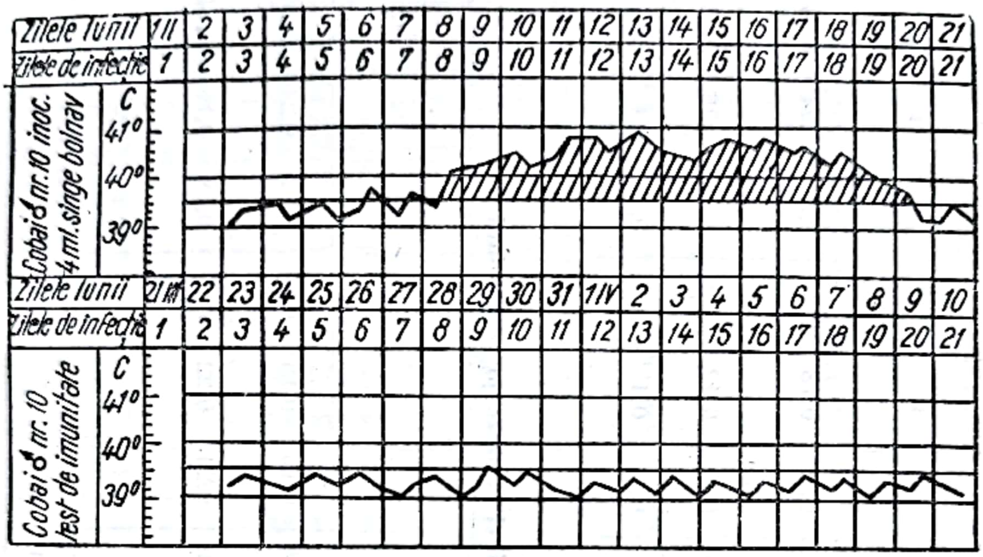


Fig. 160. — Curba febrilă a unui cobai infectat cu R. *prowazecki* (sus).

Se agită; se incubează o oră la termostat la 37°.

Titrul alexinei (*o unitate alexină*) = cantitatea de alexină din tubul imediat următor primului tub, care prezintă hemoliză completă. Exemplu: dacă primul tub care prezintă hemoliză completă conţine 0,18 ml alexină 1/40, *o unitate de alexină* = 0,20 ml din aceeaşi diluţie. În reacţiile următoare se va lucra cu *2 unităţi* (de exemplu: 1 u. alexină = 0,2 ml din diluţia 1 : 40, 2 u = 0,2 ml din diluţia 1 : 20).

Pentru practicarea corectă a reacţiei, este recomandabil ca cele două unităţi de alexină să fie cuprinse totdeauna într-un volum de 0,2 ml. În acest scop recomandăm următoarea metodă de calculare a diluţiilor luînd ca exemplu cazul în care o unitate de alexină este reprezentată de 0,18 ml din diluţia 1 : 40, iar pentru efectuarea reacţiilor avînd nevoie de 40 de tuburi. În acest caz două unităţi de alexină sînt cuprinse în 0,18 ml din diluţia 1/20 sau în 0,09 ml alexină din diluţia 1/10, ceea ce corespunde la 0,009 ml din alexina brută (+ soluţie saturată de NaCl), pentru fiecare tub de reacţie. Pentru cele 40 de tuburi în reacţie, vom avea nevoie deci de 0,009 × 40 = 0,36 ml alexină brută. Pentru a realiza izotonizarea, se adaugă o cantitate de trei ori mai mare de apă distilată (0,36 × 3 = = 1,08 ml apă distilată) şi final se aduce la volumul de 8 ml (0,2 ml pe tub × 40 de tuburi = 8 ml), prin adăugarea de ser fiziologic NaCl 0,85%. Deci 0,36 ml alexină brută (+NaCl) + 1,08 ml apă distilată + 6,56 ml ser fiziologic = 8 ml alexină diluată în aşa fel, încît să conţină două unităţi alexice pe 0,2 ml.

Tabelul LXXXV

Schema reacției de titrare a alexinei

Tubul nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	M
Alexină diluată 1 :40 ml	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20	0,22	0,24	0,26	0,28	0,30	—
Ser fiziologic NaCl 0,85 % ml	0,58	0,56	0,54	0,52	0,50	0,48	0,46	0,44	0,42	0,40	0,38	0,36	0,34	0,32	0,30	0,6
Sistem hemolitic ml	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4

Tabelul LXXXVI

Schema reacției de titrare a alexinei în prezența antigenului

Tubul nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	M
Alexină diluată 1 :40 ml	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20	0,22	0,24	0,26	0,28	0,30	—
Ser fiziologic NaCl 0,85 % ml	0,38	0,36	0,34	0,32	0,30	0,28	0,26	0,24	0,22	0,20	0,18	0,16	0,14	0,12	0,10	0,4
Antigen rickettsian diluat (0,2ml—4 u.a.) ml	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Agitare. O oră la termostat la 37°																
Sistem hemolitic ml	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4

Se agită; se lasă o oră la termostat la 37°.

Tabelul LXXXVII

Schema reacției de titrare a serului hemolitic

Tubul nr.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	M alexină	M sistem hemolitic
Ser hemolitic diluat	Diluția	1 : 1 000	1 : 1 500	1 : 2 000	1 : 2 500	1 : 3 000	1 : 4 000	1 : 5 000	1 : 6 000	1 : 7 000	1 : 8 000	1 : 9 000	1 : 10 000	1 : 11 000	1 : 12 000	1 : 13 000	1 : 14 000	1 : 15 000	1 : 16 000	1 : 17 000	1 : 18 000	1 : 19 000	1 : 20 000		
	Cantitatea în ml	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—	—
Suspensie de hematii diluate 2%, ml		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Alexină diluată 0,2 ml = 2 u. alexice		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—
Ser fiziologic NaCl 0,85%, ml		0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4

Agitare. Citire de orientare după o oră la termostat la 37° și citire definitivă după 20 de ore la + 4°.

Înainte de practicarea reacţiei de fixare a complementului, se recomandă titrarea alexinei în prezenţa antigenului rickettsian utilizat în reacţie pentru a evidenţia eventuala putere anticomplementară a acestuia. În acest scop se va proceda după schema redată în tabelul LXXVII.

Cantitatea de alexină utilizată în reacţiile următoare, se stabileşte după normele amintite mai sus.

Titrarea serului hemolitic. Se foloseşte ser hemolitic (ser de iepure antihematii de oaie), special titrat pentru RFC cu antigene rickettsiene. Acest ser, condiţionat în fiole de 1 ml poate fi păstrat timp de un an la +4°, fără a pierde din titru. Fiolele mai vechi de un an se retitrează, după schema redată în tabelul LXXVIII.

Titrul hemolizinei (1 unitate hemolitică = 1 u. h.) este reprezentat de 0,2 ml din diluţia cea mai mare, care dă hemoliză completă.

În reacţiile următoare se va lucra cu 2 u. h. De exemplu, dacă titrul hemolizinei = 0,2 ml diluţie 1/20 000, titrul de lucru = 0,2 ml din diluţia 1/10 000.

Observaţie. Serul hemolitic poate fi păstrat diluat 1 : 100 la gheţar la +4°, timp de 15 zile, fără a pierde din activitate.

Prepararea sistemului hemolitic. Sistemul hemolitic se prepară cu 10 minute înainte de a fi adăugat la tuburile de reacţie, ţinînd seama de faptul că în fiecare tub se va adăuga 0,4 ml sistem hemolitic, format din părţi egale de hemolizină diluată şi de hematii de berbec diluate 2%. În acest scop se face iniţial diluţia de hemolizină în aşa fel , încît 0,2 ml din această diluţie să conţină două unităţi hemolitice şi apoi se pregăteşte suspensia de hematii : hematiile de berbec, proaspete şi spălate de trei ori cu ser fiziologic, sînt aduse la volumul iniţial şi diluate 2% în ser fiziologic (NaCl 0,85%). Exemplu : 0,2 ml hematii + 9,8 ml ser fiziologic = 10 ml hematii 2%.

Sistemul hemolitic se obţine prin *amestecarea bruscă* a celor două elemente, *în părţi egale* (exemplu : 5 ml hemolizină + 5 ml hematii), într-un balon steril. Sensibilizarea hematiilor se face în 10 minute la termostat la 37°, după care se repartizează cîte 0,4 ml în fiecare tub de reacţie.

Titrarea antigenelor rickettsiene. În R.F.C. se folosesc antigene rickettsiene solubile, corpusculare sau totale, preparate în mod obişnuit din culturi de rickettsia pe sacul vitelin al embrionului de găină.

Materiale necesare : *1*) antigen rickettsian de titrat ; *2*) alexină titrată în ziua respectivă şi diluată (0,2 ml = 2 u. alexină) ; *3*) ser standard pozitiv (ser convalescent sau ser antirickettsian preparat pe iepure) cu titru cunoscut, inactivat, diluat (0,2 ml = 8 u. anticorpi fixatori) (de exemplu dacă 1 u. anticorpi = 0,2 ml diluţia 1 : 512, în reacţie se folosesc 8 u. adică 0,2 ml ser diluat 1 : 64). În caz că se lucrează cu seruri standard mai vechi, se recomandă retitrarea lor sau, la nevoie, utilizarea a 16 u. anticorpi ; *4*) sistem hemolitic.

a) *Titrarea puterii antigenice (specifice) a antigenului* se face după schema redată în tabelul LXXXVIII.

Titrul specific al antigenului (1 unitate de antigen) = 0,2 ml din cea mai mare diluţie de antigen care fixează intens (++++) complementul în prezenţa unui ser standard pozitiv. În R.F.C. se vor folosi 4 u.

Tabelul LXXXVIII

Tubul nr.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	M
Antigen diluat	Diluția	0	1 : 2	1 : 4	1 :8	1 :16	1 : 32	1 : 64	1 :128	1 :256	1 :512	1: 1024	—
	Cantitatea în ml	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—
Alexină diluată (0,2 ml= 2 u. alexice)		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Ser standard pozitiv diluat (0,2 ml = 8 u. anticorpi)		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Ser fiziologic NaCl 0,85 % ml		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,2
Agitare. O oră la 37°													
Sistem hemolitic ml		0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4

Agitare. Citire de orientare după o oră la 37°, și citire definitivă după 20 de ore la +4°.

antigen (exemplu : dacă 1 u. antigen = 0,2 ml din diluția 1 : 256, se va lucra cu 0,2 ml din diluția 1 : 64).

b) Titrarea puterii nespecifice (anticomplementară) a antigenului se face după schema redată în tabelul LXXXIX.

Titrul puterii anticomplementare este indicat de cea mai mare diluție de antigen, care împiedică acțiunea litică a alexinei asupra complexului hematii de oaie — ser antioaie (sistem hemolitic).

Pentru ca un antigen să fie utilizabil, este necesar ca puterea sa antigenică să fie cel puțin de 4 ori mai mare decît cea anticomplementară. Astfel, dacă puterea antigenică este de 1 : 64, titrul anticomplementar permis trebuie să fie mai mic de 1 : 16.

Tehnica reacției de fixare a complementului. Material necesar : *a*) ser de cercetat, recoltat cu precauții de sterilitate, debarasat de hematii, inactivat jumătate de oră la 56° ; *b*) antigen rickettsian diluat (0,2 ml = 4 u. antigen) ; *c*) alexină titrată în ziua respectivă în prezența antigenului și cu același sistem hemolitic, diluată (0,2 ml = 2 u. alexină) ; *d*) sistem hemolitic preparat cu 10 minute înainte de a fi adăugat : 0,2 ml ser hemolitic diluat (0,2 ml = 2 u. hemolitice) + 0,2 ml hematii 2%, incubate 10 minute la 37° ; *e*) ser de referință sigur pozitiv și ser sigur negativ (ser normal), inactivate 30 de minute la 56°.

Tabelul LXXXIX

Tubul nr.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Antigen diluat	Diluția	0	1 :2	1 :4	1 :8	1 :16	1 :32	1 :64	1 :128	1 :256	1 :512
	Cantitatea în ml	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Ser fiziologic NaCl 0,85%, ml		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Alexină diluată (0,2 ml = 2 u.a.)		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Agitare. Incubare o oră la 37°											
Sistem hemolitic, ml		0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4

Agitare. Citire provizorie după o oră la 37° și citire definitivă după 20 de ore la +4°.

Reacția se practică după schema redată în tabelul XC.

În același timp se vor efectua o serie de reacții martor pentru controlul elementelor folosite în reacție.

Tabelul XC

Tuburi		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ser de cercetat inactivat și diluat	Diluția	1 :4	1 :8	1 :16	1 :32	1 :64	1 :128	1 :256	1;512	1:1 024	1:2 048
	Cantitatea în ml	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Antigen diluat 0,2 ml = 4 u.a.		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Alexină diluată 0,2 ml = 2 u. alexice		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Agitare. Incubare o oră la 37°											
Sistem hemolitic, ml		0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4

Agitare. Citire provizorie după o oră la 37° și definitivă după 20 de ore la +4°

Martorii pentru serul de cercetat se fac pentru fiecare ser în parte. Ceilalți se fac o singură dată pentru ziua respectivă de lucru.

Citirea rezultatelor se face ținînd seama de următoarele norme: 1) absența totală a hemolizei, sediment compact de hematii, lichid supernatant perfect incolor = R.F.C. intens pozitiv (++++); 2) hemoliză foarte ușoară, sediment compact de hematii, lichid supernatant foarte slab colorat în roz = (+++); 3) hemoliză parțială (50%), sediment globular mai redus, lichid supernatant colorat în roșu = (++); 4) hemoliză aproape completă, sediment globular foarte slab, lichid supernatant colorat intens în roșu = (+); 5) hemoliză totală (absența urmelor de sediment globular) = R.F.C. negativă.

Titrul fixator al serului cercetat este indicat de ultima diluție care determină R.F.C. pozitivă de gradul ++(50%) după notația de mai sus.

Reacția de aglutinare a rickettsiilor (R. A. R.). R.A.R., propusă pentru diagnosticul rickettsiozelor de mai mulți autori (Weigl, Castañeda, Giroud), se practică după mai multe variante.

Se folosesc antigene corpusculare provenite din culturi pe sacul vitelin sau plămînul de șoarece, concentrate și purificate prin spălări repetate și centrifugări la mare turație.

După tehnica macroscopică, reacția se practică în tuburi foarte mici, de 10 mm × 65 mm, în care se pun cantități egale de antigen și diluții în serie de ser de cercetat (exemplu 0,2 ml). După incubare la baie de apă 37°, rezultatele se citesc cu ochiul liber la lumină artificială.

Reacția de microaglutinare a rickettsiilor (RMAR). Material necesar : *a*) ser de cercetat, recoltat cu precauții de sterilitate, fără hematii, inactivat 30 minute la 56°; *b*) antigen rickettsian în diluție de lucru ; *c*) ser de referință sigur pozitiv și ser sigur negativ ; *d*) ser fiziologic NaCl 0,85% ; *e*) micropipetă ; *f*) lame spălate și degresate ; *g*) pipete, plăci Petri cu diametru mare ; *h*) alcool metilic, soluție Giemsa.

Antigenul preparat în Institutul Cantacuzino (G. Zarnea, S. Novac, E. Crăcea și S. Dumitrescu) este obținut din cultură de *R. prowazeki* sau *R. mooseri* în sacul vitelin sau în plămînul de șoarece. Antigenul vitelin este purificat în prealabil prin extracții repetate cu eter. Purificarea și concentrarea antigenului se fac apoi prin centrifugări diferențiale repetate și eventual noi tratări cu eter, suspensia rickettsiană este omogenizată perfect prin expunere la vibrații ultrasonore și stabilizată prin adăugare de ser uman normal steril (conc. finală — 0,5%).

Antigenul este etalonat în raport cu valoarea sa antigenică, determinată prin RFC + RMAR — efectuate în tablă de șah — față de mai multe seruri de referință.

Reacția se efectuează pe o lamă de microscop punînd în contact 0,02 ml antigen diluat la titrul de lucru și 0,02 ml ser de cercetat, diluat în seria cu rația 2. Omogenizarea perfectă cu o baghetă fină de sticlă, apoi etalare pe o suprafață circulară cu diametrul de 1 cm.

Incubare pînă a 2-a zi la temperatura camerii în plăci Petri mari (⌀ 20 cm) cu umiditate convenabilă (hîrtia de filtru umezită). Uscare lentă — 60 minute la 37° ; fixare 3 minute cu alcool metilic. Colorare 20 minute cu Giemsa (5 picături soluție Giemsa la 1 ml apă distilată fiartă și răcită). În fiecare zi de lucru se efectuează 3 reacții martor : *a*) antigen + ser sigur pozitiv ; *b*) antigen + ser sigur negativ ; *c*) antigen + ser fiziologic.

Citirea rezultatelor se face la microscop cu imersie în raport cu mărimea grămezilor de rickettsii aglutinate și numărul rickettsiilor rămase libere : 1) *reacția pozitivă* ++++ grămezi mari de rickettsii aglutinate în ciorchini cu absența sau numai foarte puține rickettsii libere ; 2) *reacție pozitivă* +++ : grămezi mari de rickettsii cu aspect de ciorchini ramificați, cu puține rickettsii libere; 3) *reacție pozitivă* ++ : grămezi puțin voluminoase cu aspect de ciorchine cu multe rickettsii libere; 4) *reacție slab pozitivă* + : grupări mici de rickettsii în mijlocul masei de rickettsii libere; 5) *reacție negativă* — același aspect ca la martor: prezența exclusivă a rickettsiilor izolate.

Reacția de precipitare se bazează pe proprietatea extractelor rickettsiene de a acționa ca precipitinogen în prezența serului de convalescent. Devine pozitivă în ziua a cincea — a opta de boală, putînd ajunge în 94% din cazuri titrul de 1 : 128—1 : 512 în a doua — a patra săptămînă de boală (Zaițeva).

Tabelul XCI

		Martori ser de cercetat				Martori ser		Martori antigen		Martori alexină sistem hemolitic			
		1	2	3	4	Sigur normal	Sigur pozitiv	1	2	1	2	3	4
Ser de cercetat inactivat la 56° și diluat	Diluția	1 :4	1 :8	1 :16	1 :32	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cantitatea în ml	0,2	0,2	0 2	0,2	—	—	—	—	—	—	—	—
Ser sigur normal inactivat 30 de minute la 56°, ml		—	—	—	—	0,2	—	—	—	—	—	—	—
Ser de referință sigur pozitiv inactivat, diluat (0,2 ml=8u. anticorpi)		—	—	—	—	—	0,2	—	—	—	—	—	—
Antigen utilizat în reacție, diluat (0,2 ml = 4 u.a.)		—	—	—	—	0,2	0,2	0,4	0,2	—	—	—	—
Alexină diluată (0,2 ml = 2 u. alexice)		0,2	02,	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,05	0,10	0,15	0,20
Ser fiziologic NaCl 0,85% ml		0,2	0,2	0,2	0,2	—	—	—	0,2	0,55	0,50	0,45	0,40
Agitare. O oră la 37°													
Sistem hemolitic, ml		0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4

Agitare. Citire provizorie după o oră la 37° și citire definitivă după 20 de ore la +4°

Antigenele rickettsiene dau, de asemenea, reacții de precipitare prin metoda dublei difuziuni în gel de agar în prezența antiserurilor respective (G. Zarnea, N. Mitrică, H. Ionescu).

Reacția de hemaglutinare cu antigene rickettsiene (RHAR). Din culturile de *R. prowazeki* și *R. mooseri* pe sac vitelin, foarte toxigene pentru șoarece, Shih-Man Chang a izolat prin tratare cu alcali diluați la cald o substanță specifică solubilă care sensibilizează hematiile şi le face aglutinabile în prezenţa serurilor imune respective.

Substanţa sensibilizantă a hematiilor este comună din punct de vedere antigenic între *R. prowazeki* şi *R. moorseri* şi poate fi adsorbită cu uşurinţă pe hematiile umane, de berbec sau de găină.

Reacţia Weil-Felix. Sînt necesare următoarele materiale:

1. Ser sanguin de bolnav, recoltat steril cu seringă uscată, nehemolizat, la nevoie debarasat de hematii prin centrifugare.

2. Suspensie antigen alcoolat Proteus OX_{19}. În ţara noastră se recomandă practicarea reacţiei Weil-Felix exclusiv cu antigenul standard preparat de Institutul „Dr. I. Cantacuzino".

Acest antigen se prepară pornind de la tulpini de 24 de ore de Proteus OX_{19} „S". Cultura de pe o placă Roux este suspensionată în 10 ml ser fiziologic şi ţinută timp de 24 de ore în contact cu 20 ml alcool, la temperatura camerei şi la adăpost de lumină. După acest interval, suspensia este centrifugată şi spălată de 4 ori pentru a elimina urmele de alcool. Sedimentul final este resuspendat în ser fiziologic fosfatat, la pH 7,6 şi diluat în aşa fel încît să se obţină o densitate microbiană de 10 miliarde germeni pe 1 ml. Suspensia standard de Proteus OX_{19} se utilizează ca atare în reacţia Kudicke-Steuer şi diluată $^1/_{20}$ în reacţia Weil-Felix (respectiv o concentraţie de 500 miliarde pe 1 ml).

3. Ser fiziologic NaCl 0,85% steril.

Efectuarea reacţiei se face după tehnica recomandată pentru analiza calitativă serică folosită în serodiagnosticul febrelor tifo-paratifoidice (vezi capitolul fam. *Enterobacteriaceae*, genul *Salmonella*).

Interpretarea reacţiei Weil-Felix. Deşi este o reacţie nespecifică, reacţia Weil-Felix continuă să rămînă o reacţie importantă pentru diagnosticul precoce de prezumţie al mai multor rickettsioze.

Aglutininele faţă de Proteus OX_{19}, OX_2 şi OXK, cu unele excepţii, sînt prezente din ziua a şasea — a şaptea după debutul febrei în toate rickettsiozele care evoluează cu reacţia Weil-Felix pozitivă şi sînt prezente aproape totdeauna în ziua a 12-a-a 14-a de boală. Titrul lor creşte progresiv, atingînd maximul la începutul convalescenţei, după care scad la un nivel nesemnificativ pentru diagnostic, după una sau mai multe luni. Esenţial pentru diagnosticul prezumtiv de rickettsioză este creşterea în dinamică a titrului anticorpilor, în două sau mai multe examene succesive. Reacţia Weil-Felix trebuie interpretată totdeauna în corelaţie cu datele clinice şi epidemiologice. În cazul tifosului exantematic, permite deosebirea cazurilor de primoinfecţie, la care este pozitivă, de cele de reîmbolnăvire (boala Brill-Zinsser), la care este negativă sau pozitivă la titruri nesemnificative.

Tabelul XCII arată rezultate obţinute cu reacţia Weil-Felix cu antigene de Proteus OX_{19}, OX_2, OXK în diferitele rickettsioze.

Reacţia Kudicke-Steuer. Este o reacţie de aglutinare pe lamă a unui antigen Proteus OX_{19} cu sînge uscat, folosită în special în trecut în diagnosticul tifosului exantematic, ca metodă de orientare la patul bolnavului sau în anchete în masă pe teren.

Rezultatele acestei reacţii trebuie *obligatoriu* completate cu cele ale metodelor serologice specifice de diagnostic.

Tabelul XCII

Boala	Reacţia Weil-Felix cu antigen B. proteus		
	OX$_{19}$	OX$_2$	OXK
Tifos exantematic epidemic	++++	+	0
Boala Brill-Zinsser (tifos de rembolnăvire)	0 sau +	—	—
Tifos murin	+++	+	0
Febra pătată a Munţilor Stîncoşi	++++ +	+ ++++	0
Febra butonoasă	+ tardiv	+ ++++	0
Rickettsia variceliformă	0	0	0
Scrub-typhus-Tsutsugamushi	0	0	+++
Febra Q	0	0	0

Reacţia Kudicke-Steuer (KSt) nu este pozitivă decît la acele persoane care au o reacţie Weil-Felix pozitivă la un titru de peste 1 : 250.

Tehnica reacţiei. Se recoltează sîngele pe o lamă de sticlă bine curăţată şi degresată, prin puncţia pulpei degetului cu un ac steril, după antisepsie cu alcool şi apoi cu eter.

Picăturile groase se efectuează punînd lamă pe 3 picături mici de sînge, care apoi sînt amestecate circular, cu colţul altei lame, pe o suprafaţă cu diametrul de 1—1,5 cm şi în strat uniform şi subţire, pentru a face defibrinarea. Picăturile uscate, fără defibrinare prealabilă, cad de pe lamă în timpul transportului. Uscare la umbră şi adăpost de praf şi muşte. *Nu se fixează la cald.* Se notează pe fiecare lamă numele persoanei de la care s-a recoltat.

Reacţia se practică depunînd pe picătura de sînge o picătură (aproximativ 1/20 ml) antigen alcoolat Proteus OX$_{19}$. Antigenul este amestecat cu picătura de sînge cu ajutorul unei baghete de sticlă, cu colţul unei lame de microscop, (fără a o atinge şi evitînd desprinderea de fragmente de sînge uscat) şi prin înclinarea lamei în diferite sensuri. *Citirea reacţiei se face după maximum 10 minute de la adăugarea antigenului*, deasupra unei suprafeţe negre sau cu ajutorul unei lumini indirecte.

Dacă reacţia este negativă, amestecul sînge-antigen rămîne omogen şi opalescent. În caz de reacţie pozitivă se observă aglutinarea vizibilă cu ochiul liber a suspensiei de Proteus.

Dacă citirea rezultatelor se prelungeşte după 12 minute de la adăugarea antigenului, se pot observa false aglutinări (grunji foarte fini, datorită evaporării lichidelor de pe lamă). Executarea reacţiei KSt se va face totdeauna în maximum 14 zile de la recoltarea sîngelui.

Reacţia Minkiewicz este o modificare a reacţiei KSt, în care, înainte de adăugarea suspensiei de antigen, picătura de sînge este hemolizată cu apă distilată sau înlocuită de o picătură de ser de bolnav. Citirea rezultatelor este mai ușor de făcut decît după metoda Kudicke. Tehnica reacției, citirea și interpretarea ei sînt aceleași.

Reacții cutanate de diagnostic

Reacția cutanată de hipersensibilitate la antigenul rickettsian. Giroud a descris la foștii bolnavi de tifos exantematic existența unei stări de hipersensibilitate față de antigenul rickettsian, care poate fi evidențiată prin injectarea intradermică a unei suspensii formolate de Rickettsia.

În acest scop se injectează strict intradermic 0,1 ml vaccin antiexantematic (plămîn de șoarece), care la indivizii normali dă numai reacții minime.

Reacțiile pozitive sînt caracterizate prin infiltrație la locul injecției, cu edem, avînd dimensiuni mai mari de 10 mm diametru, însoțită de prurit, roșeață, temperatură locală și durere la presiune.

Reacția apare după 24 de ore, este maximă după 48 de ore și dispare între 72 și 96 de ore. Starea de alergie se instalează la foștii bolnavi de tifos exantematic după 2 luni de la apirexie și a fost evidențiată uneori chiar după 25 de ani.

Starea de hipersensibilitate consecutivă bolii a fost pusă în evidență și la foștii bolnavi de tifos murin, febră butonoasă, febră Q și *scrub-typhus.*

Testul de seroprotecție cutanată. Tehnica propusă de Giroud se bazează pe proprietatea suspensiilor de rickettsii vii și virulente de a determina, atunci cînd sînt injectate intradermic la iepure, leziuni specifice de vascularită și perivascularită, însoțite de o reacție inflamatoare, cu eritem, infiltrat nodular și necroză. Serul de convalescent, care conține anticorpi protectori, suprimă acest efect patogen, dacă este injectat concomitent cu suspensia de rickettsii.

Pentru efectuarea reacției se folosesc iepuri albi, care sînt epilați prin smulgere în regiunea flancurilor, cu două zile mai înainte de efectuarea reacției.

Pe unul din flancuri se injectează strict intradermic, la distanță de 3 cm, cîte 0,25 ml din diluții succesive (1 :10, 1 : 100, 1 : 1 000) de sac vitelin bogat în rickettsii. Pe flancul opus se injectează aceeași cantitate de suspensie rickettsiană plus 0,25 ml ser de cercetat, care au stat în contact 20 de minute la temperatura camerei.

Reacțiile martor evoluează cu eritem (după 24 de ore), la care se adaugă un nodul cu diametru de 2—3 cm (48 de ore), iar după a treia zi, necroza. Aceste fenomene sînt mai accentuate cu suspensia mai concentrată.

Rezultatele reacției de seroprotecție (rickettsii + anticorpi) sînt apreciate în comparație cu reacția martor. Cînd serul de cercetat conține anticorpi protectori, nu se produce nici o modificare locală. În prezența unui titru mic de anticorpi, leziunile apar, dar sînt mai slabe ca la martor, iar în cazul absenței complete a anticorpilor leziunile sînt identice cu cele de la martor.

Rickettsia prowazeki şi tifosul exantematic epidemic

Tifosul exantematic epidemic (istoric sau clasic) este o rickettsioză endemo-epidemică, febrilă, cu evoluţie în general severă, transmisibilă la om prin intermediul păduchelui de cap sau de corp.

Istoric. Tifosul exantematic a fost descris ca o entitate de Fracastor (1546) însă denumirea de „tifus" a fost dată abia în 1760, de Sauvage, pentru a descrie starea de confuzie mintală, cu tendinţă la stupoare a acestor bolnavi.

Natura infecţioasă a fost probată de cercetătorul rus D. O. Mociutkovski (1876), care s-a autoinfectat cu sînge de bolnav, iar Prowazek şi Da Rocha-Lima, reluînd cercetările lui Ricketts, au descris agentul patogen (1916).

Habitat. *R. prowazeki* este prezentă în sîngele omului bolnav, în conţinutul şi în celulele epiteliale ale tubului digestiv al păduchelui de corp şi de cap.

Caractere morfologice. Microorganism polimorf, apare ca un germen mic, cocoid sau ca elemente lungi, baciliforme, aşezate cel mai adesea în perechi şi ocazional în lanţuri lungi. Elementele izolate au dimensiuni variabile între 0,3 şi 0,7 μ lăţime × 0,5 şi 2 μ lungime. Se colorează frecvent bipolar, în purpuriu cu Giemsa şi roşu viu cu Macchiavello ; sînt localizate intracitoplasmatic în endoteliile vasculare şi celulele seroaselor, niciodată în nucleu.

Caractere de cultură. *R. prowazeki* nu se multiplică în medii acelulare. Se multiplică în culturi de ţesuturi de mamifere, în intestinul de păduche, în membrana corioalantoidă şi sacul vitelin al embrionului de găină.

Cel mai frecvent se folosesc culturile pe sac vitelin, prin care se pot obţine pînă la 10^9 rickettsii pe gram.

De asemenea, se pot obţine culturi foarte bogate pe plămînul de şoarece infectat pe cale nazală.

Rezistenţa la agenţi fizici şi chimici este foarte mică. *R. prowazeki* moare în 15 — 30 de minute la 50°, instantaneu la fierbere şi în cîteva ore la temperatura camerei şi la 37°. În dejecţiile de păduche ar supravieţui cîteva luni. Viabilitatea este scăzută de diluenţii obişnuiţi ca apa distilată şi serul fiziologic (NaCl 0,85%) ; diluentul cel mai bun este laptele ecremat şi soluţia de zaharoză-fosfat-glutamat, care conservă vitalitatea rickettsiilor.

Structura antigenică. *R. prowazeki* conţine un antigen solubil cu specificitate de grup, a cărui liberare în mediu este favorizată de prezenţa eterului sulfuric şi un antigen corpuscular, format dintr-un component termolabil, specific pentru *R. prowazeki* şi unul termostabil comun pentru *R. prowazeki* şi *R. mooseri*.

R. prowazeki are un factor (polizaharid alcalistabil) comun cu antigenul somatic glucido-lipido-polipeptidic al Proteului OX_{19} răspunzător de apariţia reacţiei Weil-Felix la bolnavi şi convalescenţi.

Caractere de patogenitate. *R. prowazeki* este patogenă pentru om, maimuţă, cobai, şobolan de bumbac şi păduche. Poate produce infecţii inaparente la cobai şi la om şi, obişnuit, la şoarecele alb, şobolan şi iepure.

Are un factor toxic cu efect letal pentru şoarecele alb, legat de prezenţa unei cantităţi mari de rickettsii, vii, care lezează direct celulele gazdei animale, în special endoteliul capilar, determinînd pierderea de plasmă și moarte prin scăderea progresivă a volumului sîngelui circulant.

Toxina *R. prowazeki* este imunologic distinctă de cea a *R.mooseri*. Suspensiile vii lezează de asemenea *in vitro* hematiile mai multor specii, probabil printr-un mecanism enzimatic, deoarece fenomenul se produce numai în prezența glutamatului și a magneziului.

Boala la om. După o peroadă de incubație de 10 — 14 zile urmează debutul, obișnuit brusc, cu frison, cefalee rebelă și progresivă, dureri musculare generalizate, febră 39 — 41°. Boala durează de obicei 12 — 14 zile.

Exantemul apare a patra — a șaptea zi, după care se generalizează exceptînd fața, palmele și plantele. Este la început macular, apoi maculopapular și peteșial, fără a dispărea la presiune, uneori net hemoragic. În cazurile grave se observă delir, confuzie mintală, prostrație, stupoare și comă. Letalitatea este mai mare la bătrîni (5 — 23%).

Infecția experimentală. Cobaii inoculați intraperitoneal fac, după o incubație de 7 — 9 zile, o boală febrilă de 7 — 10 zile, cu caracter continuu și oscilații mici în jurul a 40 — 40°,5, după care se vindecă fără sechele.

Circa 5% din animale fac boala inaparent, chiar după inocularea unei tulpini adaptate. La necropsie se constată prezența unui exsudat fibrinos pe suprafața splinei, în care se pot evidenția cîteva celule seroase mari, pline cu rickettsii.

Trecerile următoare se fac cu creier, splină, glande suprarenale sau sînge.

Șoarecele alb inoculat intravenos sau intraperitoneal cu o suspensie foarte concentrată de rickettsii vii, face o intoxicație mortală în 4-12-18 ore. După inocularea intraperitoneală cu o cantitate relativ mică de rickettsii face o infecție inaparentă, în timp ce după injectarea intranazală, sub narcoză, face o pneumonie specifică rickettsiană, mortală în 4 — 5 zile de la inoculare, cu prezența unui mare număr de rickettsii.

Șobolanul de bumbac este un animal extrem de sensibil, care face o rickettsioză generalizată, în 2 — 8 zile de la infectarea intracardiacă, cu sfîrșit letal și acumulare de rickettsii în creier și ficat.

Păduchele de corp (*Pediculus corporis*) se infectează de regulă după 3 — 7 zile de la prînzul infectant (sau după inocularea prin clismă intraanală), urmată de moarte după 7 — 25 de zile, cînd celulele care mărginesc tubul intestinal și dejecțiile sînt pline de rickettsii. Păduchii aflați în perioada de stare a bolii au o culoare roșiatică, datorită unei mai mari difuzibilități a sîngelui din tubul digestiv prin peretele intestinal, ca urmare a intoxicației și a distrugerilor epiteliale.

Imunitate. Infecția la om determină o stare de imunitate destul de solidă, care scade însă treptat, permițînd apariția de reîmbolnăviri după cîțiva ani de la primoinfecție. Imunitatea în tifosul exantematic ar fi determinată de persistența rickettsiilor în stare latentă în organismul foștilor bolnavi (stare de premuniție), astfel că în patogenia reîmbolnăvirilor, în afară de reinfecția prin păduche ar fi posibile recăderi (redeșteptări) ale infecției latente (boala Brill-Zinsser).

Tifosul exantematic nu poate fi deosebit în teste de imunitate de tifosul murin. Poate fi deosebit însă de alte rickettsioze, deși există un grad variabil de imunitate încrucișată reciprocă parțială.

Diagnostic de laborator

Diagnosticul bacteriologic se face prin inoculare intraperitoneală la cobai a 4 — 5 ml sînge de bolnav, recoltat în primele 3 — 4 zile de febră sau prin inoculare directă în sacul vitelin al oului embrionat de 6 — 7 zile (0,5 ml sînge defibrinat).

Diagnosticul serologic. *Reacția de fixare a complementului* cu antigen solubil, corpuscular sau total de *R. prowazeki* este pozitivă în 98% din cazuri, începînd din ziua a șasea — a șaptea de boală, la un titru care crește pînă în a 20 — 25-a zi, după care scade progresiv, rămînînd pozitivă la titruri mici 10 — 50 de ani de la infecție (diagnostic retrospectiv).

Titrul semnificativ pentru diagnostic, variabil după condițiile epidemiologice locale, este pentru regiunile endemice, în general 1 :32.1 :64, *cu condiția creșterii în dinamică*, paralel cu evoluția bolii.

Reacția de microaglutinare a rickettsiilor (RMAR) devine pozitivă începînd din ziua 4—5-a de boală, la un titru care crește în dinamică în timpul bolii, pentru a scădea apoi, începînd din luna a 2-a, rămînînd pozitivă la titruri mici chiar după 4 ani.

Rezultatele sînt totdeauna concordante cu RFC, care înregistrează însă în timpul bolii în mod constant titruri mai ridicate.

RMAR este strict specifică și constant pozitivă la bolnavi, chiar în cazurile care evoluează cu reacția Weil-Felix negativă.

Analiza variațiilor de titru date de RFC și RMAR arată că în timp ce în primele luni de boală cele două reacții sînt deopotrivă de fidele, începînd din luna a II-a, cînd titrurile scad, RMAR dă rezultate mai constante (variații mai mici) decît RFC (G. Zarnea, S. Novac, I. Buzdugan, L. Ianopol și colab.).

Reacția de hemaglutinare. Datele preliminare ale studiului valorii acestei metode efectuat pe cazuri de reîmbolnăviri (G. Zarnea, S. Novac, I. Buzdugan și colab.) au arătat că RHAR este o metodă specifică și sensibilă care dă rezultate perfect concordante cu celelalte metode serologice specifice (RFC și RMAR).

Reacția de hemaglutinare se pozitivează în prima săptămînă de boală (cel mai precoce în ziua a 4-a) la un titru care crește progresiv în săptămîna a 2-a și a 3-a, după care descrește treptat.

După maximum 6 luni de la debutul bolii titrul reacției scade sub nivelul minim semnificativ pentru diagnostic, fapt care reprezintă, în condițiile epidemiologice din țara noastră, un mare avantaj, deoarece cu RHAR se pot deosebi infecțiile recente de titrurile anamnestice și reziduale observate prin RFC și RMAR în mediu endemic la foștii bolnavi.

Reacția Weil-Felix, pozitivă în ziua a șasea — a șaptea de boală, la un titru care crește treptat în timpul bolii, se negativează după cîteva săptămîni sau luni. Are semnificație pentru diagnostic dacă este pozitivă la un titru de 1: 500, care crește ulterior, și dacă este în concordanță cu evoluția clinică și situația epidemiologică.

Reacția Kudicke-Steuer sau modificarea Minkiewicz sînt aplicabile ca reacții de orientare. Trebuie controlate obligatoriu cu metodele specifice de diagnostic.

Epidemiologie

Tifosul exantematic, în trecut o infecţie foarte răspîndită, cu epidemii foarte grave însoţind războaiele, secetele etc., este azi pe cale de eradicare în foarte multe ţări.

Rezervorul de virus este reprezentat de omul bolnav în special în perioada febrilă a bolii, iar vectorul, de păduchele de corp (*P. corporis*) sau de cap (*P. capitis*). Transmiterea la om se face prin introducerea dejecţiilor de păduche contaminate prin plaga produsă de înţepătură sau prin leziunile de grataj.

Profilaxia specifică. Seroprofilaxia cu ser de convalescent sau ser hiperimun are putere neutralizantă specifică, dacă serul este administrat în doze relativ mari şi foarte precoce după contaminare. Nu are putere curativă asupra rickettsiilor localizate intracelular.

Vaccinarea antiexantematică. 1. Cel mai frecvent folosite sînt vaccinurile omorîte: Weigl (preparat din intestine de păduche), Castañeda (plămîn de şoarece) sau Cox (sac vitelin), care sînt formolate 0,2 — 0,4%.

Valoarea lor imunogenă este proporţională cu bogăţia în rickettsii; injectarea a 3 doze (0,5 ml, 1 ml, 1 ml, la interval de 5—7 zile) dă o imunitate relativă şi de scurtă durată (6 luni-1 an).

2. Vaccinurile vii au avantajul că se fac cu o singură injecţie, dau o imunitate mai precoce şi mai solidă.

Vaccinul Blanc foloseşte rickettsii murine atenuate după 15 minute de contact cu bila de bou. Poate da accidente, din cauza atenuării incomplete.

În prezent în U. R. S. S. (P. F. Zdrodovski) şi în S. U. A. se fac cercetări pentru aplicarea la om a unui vaccin viu atenuat cu tulpina „E" („Espana", a lui G. Clavero şi F. P. Gallardo) de *R. prowazeki* cu virulenţă atenuată şi fixă. Tulpina „E" este identică cu *R. prowazeki* din punct de vedere morfologic, al aspectelor de cultură, serologic şi al toxicităţii. Are o patogenitate mult scăzută faţă de tulpina clasică şi produce la cobai numai infecţii inaparente, chiar după inoculări masive. Imunitatea conferită de vaccinul viu atenuat preparat cu tulpina „E" este suficient de solidă, dar inferioară la cobai celei date de infecţia cu tulpinile clasice virulente.

Rickettsia mooseri şi tifosul exantematic murin

(Sin. tifos endemic, rickettsioza murină, tifos de purice sau de şobolan, tifos urban de Malaya)

Tifosul exantematic endemic sau murin este o rickettsioză acută, în general benignă, înrudită cu tifosul exantematic clasic, care infectează în condiţii naturale rozătoarele şi de la care este transmis sporadic la om prin intermediul puricelui de şobolan.

Agentul patogen al tifosului murin este *Rickettsia mooseri* (sin. *R. typhi*, *R. prowazeki*, *var. mooseri*).

Istoric. Tifosul murin a existat probabil din cele mai vechi timpuri, însă diferenţierea lui de tifosul epidemic de păduche a fost făcută abia în 1928, de Mooser, care a izolat şi a studiat particularităţile agentului patogen şi a dat acestei noi entităţi numele de tifos murin, pentru a indica originea lui ca o infecţie naturală a şobolanilor

Habitat *Rickettsia mooseri* infectează în natură şobolanii sălbatici, şoarecii de cîmp şi paraziţii lor — puricii — (*Xenopsylla cheopis*, *X. astia*, *Nosopsylla fasciatus*) şi păduchii de şobolan (*Poliplax spinulosus*).

Caractere morfologice. *R. mooseri* este foarte asemănătoare, ca formă, dimensiuni şi caractere tinctoriale cu *R. prowazeki*, dar mai puţin polimorfă. Are dimensiuni cuprinse între 0,35 şi 0,6 μ × 0,7 şi 1,3 μ.

Caractere de cultură. *R. mooseri* poate fi cultivată uşor pe sacul vitelin şi membrana corioalantoidă a oului de găină embrionat, în plămînul de şoarece şi de şobolan infectat intranazal) în plămînul de iepure infectat intratraheal. Temperatura optimă de dezvoltare: 35°. Se înmulţeşte în mod caracteristic şi mult mai abundent decît *R. prowazeki* în citoplasma celulelor mezoteliale, formînd uneori aglomerări caracteristice, care înlocuiesc protoplasma distrusă a celulelor parazitate.

Rezistenţa la agenţi fizici şi chimici este similară cu a *R. prowazeki.*

Structura antigenică. Din suspensiile de *R. mooseri* cultivată pe oul embrionat a fost obţinut un antigen solubil, care nu poate fi diferenţiat de cel al *R. prowazeki* şi un antigen corpuscular care, în afară de un component strict specific, conţine şi fracţiuni antigenice comune cu *R. prowazeki*.

Posedă un factor antigenic comun cu Proteus OX_{19}.

Caractere de patogenitate. Este patogenă pentru om, maimuţă, iepure, cobai, şobolan şi şoarecele alb.

Boala la om. Tifosul murin uman este similar tifosului exantematic de care se deosebeşte numai prin benignitatea sa. Nu poate fi diferenţiat clinic de tifosul clasic, ci numai cu ajutorul probelor epidemiologice şi de laborator. După o perioadă de incubaţie de 8—12 zile, boala începe în general mai treptat decît tifosul exantematic, cu cefalee, stare generală rea, urmată de febră (38 — 40°). Erupţia caracteristică apare în a şasea — a şaptea zi de boală, şi este mai puţin evidentă şi cu durată mai scurtă decît în tifosul epidemic. Perioada febrilă durează 9 — 14 zile, după care scade în lizis şi este urmată de vindecare fără sechele. Sistemul nervos, miocardul şi rinichii sînt mai puţin afectaţi ca în tifosul exantematic. Complicaţiile (parotidite, necroze cutanate, gangrene ale extremităţilor azotemie) apar de asemenea mai rar.

Boala experimentală. *Cobaii* inoculaţi intraperitoneal cu o suspensie de *R. mooseri* fac, după o incubaţie de 4 — 6 zile, o reacţie febrilă, de obicei mai puţin pronunţată decît în tifosul epidemic, care durează 6 — 8 zile, cu oscilaţii în jurul a 40°. La cobaii masculi febra este însoţită de o reacţie scrotală (semnul Neill-Mooser), care apare ca o tumefiere a sacului scrotal, cu roşeaţa pielii, edem elastic indolor şi aderent între testicul şi tunica vaginală. Cînd edemul este foarte accentuat, testiculele nu mai pot fi introduse în abdomen. Reacţia scrotală apare o dată cu febra, sau o precede, şi dispare în momentul defervescenţei. Ea exteriorizează o periorhită precoce, fugace şi indoloră, care la necropsia cobaiului apare ca o congestie a tunicilor vaginale cu sufuziuni sanguine, cu mici pete hemoragice subseroase.

Examenul microscopic al amprentelor de tunică vaginală arată prezenţa unor celule endoteliale mari, caracteristice — celulele Mooser — pline cu un număr mare de rickettsii. Trecerile la cobai se fac cu tunică vaginală şi lichid de spălătură testiculară, creier şi sînge de la animalele infectate.

Inițial s-a crezut că reacția scrotală este un semn diferențial patognomonic între tifosul murin și cel epidemic. Ulterior s-a demonstrat însă că ocazional tulpinile epidemice pot deveni orhitogene, după cum cele murine pot pierde temporar acest caracter — ca de exemplu în lunile de vară — pentru a-l recăpăta iarna. De aceea, pentru precizarea diagnosticului, trebuie completate rezultatele bolii experimentale cu testele serologice și de imunitate încrucișată.

Șobolanii albi infectați intraperitoneal cu *R. mooseri* fac o reacție febrilă de mai multe zile, însoțită de orhită la masculi, urmată de o persistență îndelungată a virusului în organism, pînă la 495 de zile (S. M. Kulaghin).

Animalele infectate intranazal sub narcoză cu eter fac o pneumonie generalizată cu prezența unui număr foarte mare de rickettsii.

Rickettsiile murine pot fi menținute indefinit, prin treceri în serie la șobolanii albi, în timp ce tulpinile epidemice mor după 2—3 treceri.

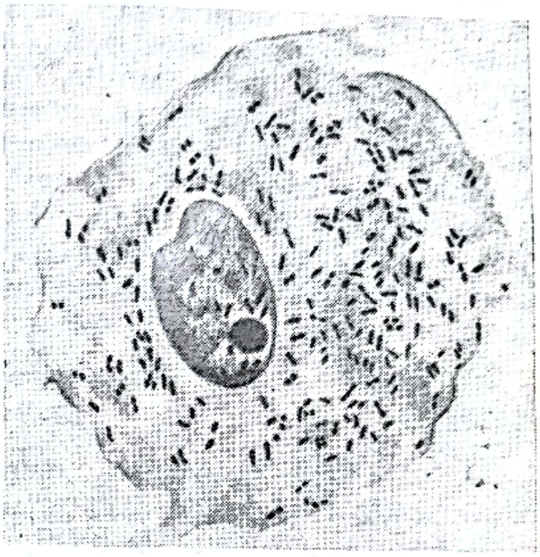


Fig. 161. — Celulă Mooser din tunica vaginală a testiculului de cobai infectat cu *B. mooseri* (desen).

Șoarecii sînt, de asemenea, sensibili la infecția intranazală cu *R. mooseri*, care se dezvoltă mult mai abundent decît *R. prowazeki*.

Imunitate. Infecția la om lasă o imunitate solidă, care durează cel puțin cîțiva ani. Reacțiile de imunitate încrucișată pe animale infectate cu *R. mooseri* și *R. prowazeki* arată că cele două virusuri sînt foarte strîns înrudite, deși nu sînt antigenic absolut identice.

Diagnosticul de laborator

Diagnosticul bacteriologic se face ca la tifosul exantematic, inoculînd intraperitoneal, la 2 cobai masculi, 3—5 ml sînge venos recoltat de la bolnavi în perioada febrilă sau direct în sacul vitelin al oului embrionat, urmat de izolarea și identificarea agentului patogen.

Diagnosticul serologic folosește reacții ca în tifosul exantematic epidemic, cu mențiunea că nu există deosebiri în ceea ce privește momentul apariției, evoluția și existența diferitelor tipuri de anticorpi.

În regiunile în care cele două infecții coexistă, rezultatele examenelor serologice sînt mai dificil de interpretat, din cauza reacțiilor încrucișate. De menționat totuși că serurile bolnavilor de tifos murin dau totdeauna titruri mai ridicate (2—8 ori) cu antigenul omolog (*R. mooseri*) decît cu antigenul heterolog (*R. prowazeki*) atît în reacția de fixare a complementului, cît și în reacția de aglutinare a rickettsiilor.

Reacția Weil-Felix pozitivă cu Proteus OX_{19} și mai rar cu Proteus OX_2 apare cu oarecare întîrziere, comparativ cu tifosul epidemic, și se caracterizează prin titruri mai scăzute.

Epidemiologie

Rezervorul de virus în natură este şobolanul sălbatic, la care infecţia este transmisă prin puricele de şobolan (*X. cheopis*) şi păduchele de şobolan (*Polyplax spinulosus*). Transmiterea de la şobolan la om se face prin intermediul puricelui de şobolan (*X. cheopis*), care în momentul înţepăturii depune fecalele, ce pot fi introduse în plaga produsă prin înţepătură sau prin leziunile de grataj. Infecţia la om apare sub formă de cazuri sporadice, în general unice într-o familie, în special vara şi toamna, la persoane care trăiesc în regiuni infestate cu şobolani (tifos „endemic"). În cazurile în care infecţia evoluează în colectivităţi aglomerate, bogat infestate cu păduchi şi cu condiţii rele de igienă, infecţia se poate transmite de la om la om prin intermediul păduchelui de corp (*P. corporis*) iar evoluţia cazurilor poate deveni identică cu cea a tifosului epidemic (în funcţie de condiţiile epidemiologice locale poate apărea epidemic).

Tifosul exantematic de recădere

(Boala Brill-Zinsser)

Boala Brill-Zinsser este o recrudescenţă, cu evoluţie benignă a unui tifos exantematic de păduche care se produce la cîţiva ani de la primoinfecţie.

Agentul patogen este o tulpină de *R. prowazeki*, cu aceleaşi caractere morfologice, biologice şi de patogenitate ca şi tulpinile izolate de la cazurile de primoinfecţie.

Istoric. Primele cazuri de boală semnalate de Brill au fost confundate cu febra tifoidă (1898) şi ulterior cu tifosul murin. Zinsser (1934) le consideră ca o redeşteptare a infecţiei la foştii bolnavi, iar Loeffler şi Mooser (1952) îi dau numele de boala Brill-Zinsser.

Clinic evoluţia este asemănătoare cazurilor de tifos exantematic benign. Durata perioadei de incubaţie este scurtă (7-11 zile), cu temperatură mai mică şi neregulată şi cu tendinţa de oscilaţii largi. Exantemul poate lipsi. De asemenea lipsesc fenomenele nervoase, complicaţiile etc.

Patogenie. Se consideră că, la aproximativ 3% din foştii bolnavi de tifos exantematic, vindecarea clinică este urmată de o persistenţă a rickettsiilor în stare latentă în organism (premuniţie), fapt probat de Price care a izolat *R. prowazeki* din ganglionii limfatici de la doi foşti bolnavi, care prezentau un titru scăzut de anticorpi în sînge, după 12-20 de ani de la primoinfecţie. Nu se cunosc cauzele care pot determina activarea infecţiei latente şi apariţia unei recrudescenţe (boala Brill-Zinsser). Au fost încriminate şocurile şi traumatismele fizice şi psihice, infecţiile intercurente, surmenaj, boala serului, şoc postvaccinal etc.

Diagnosticul de laborator

Diagnosticul bacteriologic. Datorită rickettsiemiei mai slabe ca în cazurile de primoinfecţie, izolarea agentului patogen prin inocularea la cobai reuşeşte numai în aproximativ 18% din cazuri. Rezultate mai bune se obţin prin inocularea la şobolanul de bumbac sau prin hrănirea directă a unui lot mare de păduchi pe bolnav în primele zile de boală (36-50% rezultate pozitive). Cobaii fac obişnuit o boală atenuată, în general, după 2-3 treceri oarbe.

Diagnosticul serologic. R.F.C. cu antigen *R. prowazeki*, pozitivă în 100% din cazuri, este mai precoce decît în cazurile de primoinfecție, respectiv în ziua a 4-a — a 6-a de la debut, ajungînd titrul maxim după 8—10 zile.

Întrucît foștii bolnavi, ca și persoanele care au trăit în zone endemice au anticorpi fixatori perioade foarte îndelungate de timp, R.F.C. are semnificație de diagnostic pentru boala Brill-Zinsser numai dacă este asociată cu o stare de boală (febră, cefalee, uneori exantem) și dacă titrul R.F.C. crește de patru ori față de nivelul inițial.

Reacția Weil-Felix este fără importanță practică, deoarece este constant negativă sau pozitivă la titruri nesemnificative.

Epidemiologie

Cazurile de tifos exantematic de reîmbolnăvire apar sporadic, în general unice într-o familie, la persoane neparazitate și cu predominanță la cei în vîrstă mai înaintată.

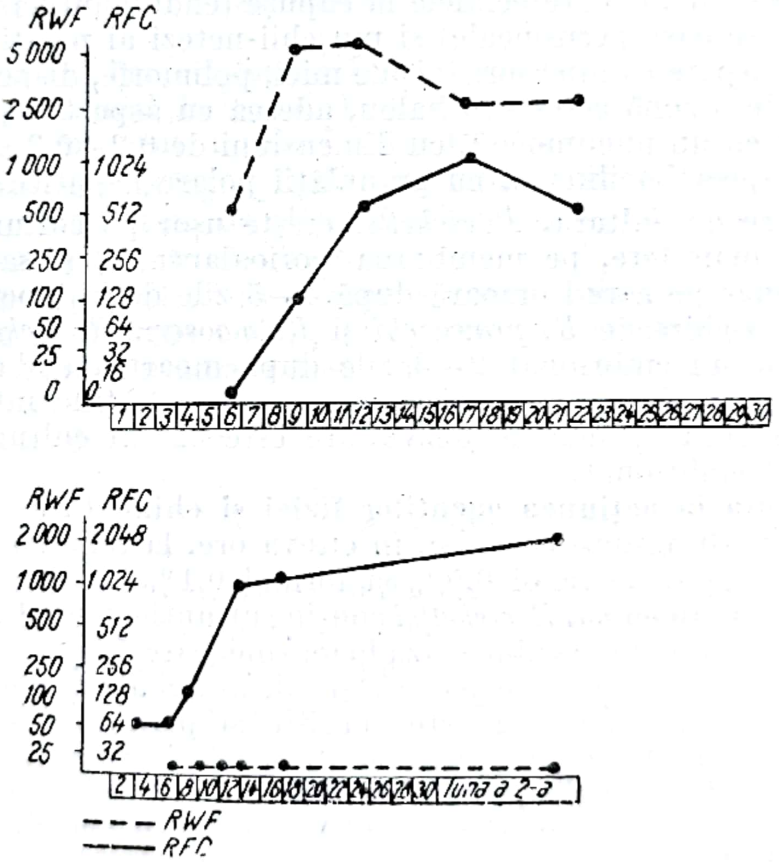


Fig. 162. — Dinamica R.F.C. și R.W.F. la bolnavi de tifos exantematic de primă infecție și reîmbolnăvire.

Apar cel mai frecvent după 10 ani de la primoinfecție și au o evoluție foarte benignă, ceea ce face ca multe cazuri de boală să nu fie diagnosticate. Au mare importanță epidemiologică. Boala Brill-Zinsser, evoluînd în colectivități infestate cu păduche, poate origina focare noi și în caz de infestare masivă, chiar epidemii de tifos exantematic.

Rickettsia rickettsii și febra pătată a Munților Stîncoși

Febra pătată a Munților Stîncoși este o rickettsioză acută, endemică în America de Nord și Sud, cu evoluție în general gravă, care evoluează ca o infecție generalizată a vaselor sanguine mici, periferice.

Agentul patogen al febrei pătate, *Rickettsia rickettsi* (sinonime *Dermacentroxenus rickettsi*, *Ixodoxenus rickettsi*) este specia tip a subgenului *Dermacentroxenus*.

Istoric. Boala a fost recunoscută în 1873 în regiunea Montana (Munții Stîncoși) și studiată de Ricketts (1906—1909) care a descoperit agentul patogen, transmiterea lui prin căpușe și a studiat boala experimentală. Studiul agentului patogen a fost reluat de Wolbach, care i-a precizat poziția sistematică și i-a dat numele de *R. rickettsi*.

Habitat. *R. rickettsi* a fost găsită în natură la căpușele din genurile *Dermacentor*, *Amblyomma*, *Rhipicephalus*, *Ornithodorus*, ș.a. la rozătoare sălbatice mici, cîini, iepuri sălbatici, oi etc.

Caractere morfologice. Parazit intracelular, intranuclear și intracitoplasmatic, prezent în toate celulele la căpușe (endoteliul vascular, macrofage, celulele seroase peritoneale) și mușchii netezi ai pereților arteriolari la mamifere. Apare ca microorganisme mici, polimorfe, dispuse în perechi, înconjurate de o zonă clară sau halou, adesea cu aspect lanceolat, semănînd aparent cu un pneumococ, cu dimensiuni de 0,2—0,3 μ × 1—1,2 μ. Uneori, cu aspect baciliform, cu granulații polare roșiatice sau purpurii.

Caractere de cultură. *R. rickettsi* crește ușor pe culturi de țesuturi cu celule de mamifere, pe membrana corioalantoidă și sacul vitelin al oului embrionat pe care-l omoară după 4—5 zile de la inoculare.

Spre deosebire de *R. prowazeki* și *R. mooseri*, *R. rickettsi* continuă să crească pe oul embrionat 2—3 zile după moartea embrionului. Formează în nucleii celulari grămezi compacte, care destind întregul nucleu.

Temperatura optimă de dezvoltare este 32° în culturi de țesuturi și 35°, în oul embrionat.

Rezistența la acțiunea agenților fizici și chimici este mică.

Moare în 10 minute la 50° și, în cîteva ore, la temperatura camerei. Este distrusă rapid de fenol 0,5% și formol 0,1%.

Structura antigenică. *R. rickettsi* conține un antigen solubil și o substanță serologic activă care sensibilizează hematiile, care dau reacții încrucișate cu rickettsiile celorlalte febre pătate și un antigen corpuscular — care, obținut în stare pură, este foarte specific și permite eosebirea febrei pătate a Munților Stîncoși de alte boli din același grup.

Patogenitate marcată pentru om, maimuță și cobai, mai moderată pentru iepure, șobolan alb, cîine etc. Are o toxină cu efect letal și un factor hemolitic.

Boala la om. Este una din cele mai grave boli infecțioase. Incubația 2—12 zile (medie 4—8 zile), debut lent, cu prodroame sau brusc, cu frison, cefalee, mialgii, artralgii, prostrație, febră 39—41°, confuzie mintală, agitație, delir, comă urmată de sfîrșit letal cu fenomene cardiace sau edem pulmonar. Erupția apare după 2—6 zile de la debut, are caracter generalizat și aspect macular, apoi maculo-papular și peteșial, cu placarde confluente hemoragice, roșu închis sau necrotice. Boala umană evoluează ca o infecție generalizată a vaselor sanguine mici, periferice, în care produce necroză, tromboze și extravazare de sînge, cu microinfarcte în piele, țesutul subcutanat și sistemul nervos central.

Boala experimentală. Cobaii foarte sensibili la infecția cu *R. rickettsii* fac după 3—7 zile de la inoculare o boală febrilă (40° și peste) care durează 5—14 zile, cu inapetență, zbîrlirea părului, reacție scrotală (roșeață și tumefiere, apoi necroză, urmată de eliminarea porțiunilor necrozate), necroze ale urechilor și labelor.

Mortalitatea este variabilă după virulența tulpinii, între 25% (tulpina estică) și 100% (tulpina vestică).

La necropsie se constată edem și hemoragii în pielea și țesutul subcutanat al scrotului, urechilor și labelor, adenopatie, splenomegalie, testicule mărite, congestionate, cu hemoragii și aderențe la scrot, necroze.

Trecerile se fac cu splină, sînge, vaginală și testicul.

Imunitate. Cobaii infectați cu *R. rickettsi* capătă o imunitate solidă față de o tulpină omologă.

Diagnosticul de laborator

Diagnosticul bacteriologic. Izolarea agentului patogen se face inoculînd intraperitoneal la cobai 1 ml sînge de la cazurile umane foarte grave și cîțiva ml pentru cele foarte ușoare.

Diagnosticul serologic. R.F.C. cu antigen rickettsian purificat, care diferențiază febra pătată de alte rickettsioze, se pozitivează în a 2-a săptămînă de boală și persistă 6—8 luni.

Reacția Weil-Felix are o valoare foarte relativă pentru diagnostic. Este pozitivă cu Proteus OX_{19} și OX_2 numai în cazurile moderate și grave de boală începînd din ziua a 10-a—a 15-a de boală, alteori numai tardiv în convalescență și negativă în cele ușoare. Titrul semnificativ pentru diagnostic este de 1 : 500.

Epidemiologie

Febra pătată este prezentă în America de Nord și Sud sub mai multe forme, aparent geografic diferențiate (varietatea estică și vestică a S.U.A., tifosul brazilian de São Paolo etc.) care se deosebesc în realitate prin gravitatea evoluției clinice. Rezervorul de virus în natură este reprezentat de căpușele *Dermacentor andersoni*, *D. variabilis*, *D. occidentalis*, *Amblyomma americanum*, *A. maculatum*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Ornithodorus parkerim* care acționează ca vectori, dar care transmit infecția transovarian la descendenți. Omul este numai o gazdă incidentală, iar diferitele animale parazitate de căpușe (rozătoare, cîini, oi etc.) pot acționa ca rezervor temporar de virus. Boala dispare în regiunile cu agricultură intensivă, prin lichidarea focarului natural.

Profilaxia specifică se poate face cu un vaccin omorît, preparat pe sacul vitelin sau țesuturi de căpușe infectate, care, administrat iarna sau primăvara, conferă imunitate totală pentru tulpinile mai atenuate și parțială pentru cele foarte virulente.

Rickettsia conori şi febra butonoasă

(Sin.: febra escaronodulară, febra de Marsilia, tifos de Kenya, febra de căpuşe sud-africană, tifos de căpuşe, etc.)

Febra butonoasă este o rickettsioză acută, febrilă, cu evoluţie în general benignă, transmisibilă prin căpuşe, caracterizată printr-o pată neagră la locul înţepăturii şi o erupţie maculo-papulară generalizată.

Rickettsia conori (sin. *Dermacentroxenus rickettsi* var. *pijperi*) — agentul patogen al febrei butonoase, face parte din subgenul *Dermacentroxenus.*

Cercetările recente arată că *R. conori* poate fi considerată agent etiologic al tuturor formelor de tifos de căpuşe întîlnite în regiunile mediteraneene ale Europei, în Asia şi Africa, cunoscute sub denumiri regionale (febra de Marsilia, tifos de Kenya etc.).

Istoric. Febra butonoasă a fost descrisă de Conor şi Bruch în 1910 în Africa de nord, după care a fost semnalată în regiunea Mediteranei, Asia şi Africa. Agentul patogen a fost descoperit în 1932 de Caminopetros şi descris de Brumpt sub denumirea de *R. conori* în amintirea lucrărilor lui Conor.

În ţara noastră a fost semnalată în 1910 şi studiată multilateral de Combiescu şi Zotta.

Habitat. *R. conori* este prezentă în natură la cîine şi aproape în toate ţesuturile căpuşei de cîine *Rhipicephalus sanguineus*, la care este trasmisă transovarian.

La om este găsită în sînge în perioada iniţială a bolii, la locul afectului primar şi în rozeolele exantemului.

Caractere morfologice. *R. conori* este un microorganism polimorf, lanceolat, diplococoid sau diplobacilar cu dimensiuni variind între 0,3—0,4μ × 1,0—1,75 μ, care prezintă forme mai mici şi mai cocoide cînd apar în grămezi compacte. Se colorează bine ca şi celelalte rickettsii, cu coloraţia Macchiavello sau Graçian.

Prezent în citoplasmă şi mai ales în nucleul celulelor infectate (caracter foarte important pentru genul *Dermacentroxenus*).

Caractere de cultură. *R. conori* nu a fost cultivată pe medii artificiale. Poate fi cultivată în sacul vitelin şi membrana corioalantoidă a oului de găină embrionat şi în culturi de ţesuturi cu plasmă coagulată şi celule de mamifere, după metoda Maitland.

Înmulţirea intracitoplasmatică este mult mai săracă decît la *R. prowazeki*. Multiplicarea intranucleară se observă bine şi în celulele mezoteliului tecii vaginale la cobaii masculi în care rickettsiile apar sub forma de colonii compacte — roşii-rubinii — rotunde sau neregulate, diseminate în substanţa nucleară albastră.

Rezistenţa la agenţii fizici şi chimici este foarte slabă. Sîngele uman îşi pierde virulenţa după 12 zile la gheţar.

Structură antigenică. *R. conori* conţine un antigen solubil şi un antigen corpuscular care pot fi obţinute după acelaşi procedeu ca la celelalte ricketsii şi care sînt înrudite imunologic cu *R. rickettsi*, cu care dă reacţii serologice încrucişate.

Posedă un factor antigenic comun cu *Proteus* OX_{19} şi OX_2, datorită căruia dă reacţii Weil-Felix pozitive cu antigenele respective.

Patogenitate. *R. conori* este patogenă totdeauna pentru om şi cobai şi în grade diferite pentru cîine, spermofil, iepure şi şoarecele alb. Virulenţa pentru cobai este de asemenea variabilă însă tulpinile iniţial puţin virulente se pot adapta după 10—12 treceri dînd infecţii tipice transmisibile în serie.

Căpuşele, la care infecţia cu *R. conori* este ereditară (Combiescu şi Zotta), păstrează rickettsiile mai mult de 18 luni, fără a suferi un efect nociv aparent.

Boala la om. Perioada de incubaţie durează 5—7 zile, ocazional pînă la 18 zile. Debutul bolii este brusc cu frison şi febră cu durată de 8—14 zile, urmată de scăderea în lizis.

La locul înţepăturii, în mod obişnuit pe părţile acoperite ale corpului, în momentul debutului bolii apare o ulceraţie mică — pata neagră — care poate persista pînă la scăderea temperaturii, fiind însoţită de reacţii inflamatoare în ganglionii regionali.

Erupţia maculo-papulară apare la 3—4 zile după frisonul iniţial şi este generalizată, cuprinzînd întreg corpul inclusiv palmele, plantele şi faţa. În cazurile grave, erupţia devine hemoragică şi persistă după defervescenţă.

Infecţia experimentală. Cobaii infectaţi intraperitoneal fac după o incubaţie variabilă de 3—7 zile, în funcţie de doza infectantă o boală febrilă cu durata de 4—9 zile, cu mici oscilaţii în jur de 40°, însoţită de o periorhită de intensitate variabilă, care apare în primele zile de febră şi se poate menţine în apirexie.

La necropsie se constată splenomegalie, hiperemia suprarenalelor, congestie şi hemoragii în vaginalele testiculelor.

Pe frotiurile făcute cu amprente de vaginala testiculelor se pot pune în evidenţă ricketssiile libere sau incluse în citoplasmă şi în nucleii celulelor. Trecerile la cobai se fac cel mai bine cu lichid de spălătură şi triturat de vaginală testiculară, creier, splină şi suprarenală.

Şobolanii infectaţi intraperitoneal fac o boală febrilă transmisibilă în serie, fără periorhită sau cu uşoară hiperemie a tecilor testiculare şi o periorhită rickettsiană cu acumulare considerabilă de lichid seros în cavitatea abdominală şi prezenţa rickettsiilor pe frotiuri, intra- şi extra-celular (Golinevici).

Şoarecii infectaţi intranazal fac o pneumonie specifică — în general săracă în rickettsii, iar cei infectaţi intraperitoneal fac o rickettsioză peritoneală, cu prezenţa rickettsiilor în celulele mezoteliale.

Imunitate. Durata imunităţii după boala umană nu este cunoscută. Infecţia experimentală la cobai cu *R. conori* imunizează încrucişat faţă de febra pătată a Munţilor Stîncoşi.

Diagnosticul de laborator

Diagnosticul bacteriologic. Izolarea agentului patogen prin inocularea intraperitoneală la cobai masculi a 3—5 ml sînge recoltat de la bolnav pe cît posibil în primele zile de boală, nu reuşeşte constant. Întrucît cobaii sînt relativ rezistenţi la infecţia cu *R. conori*, în cazul izolărilor primare de la bolnav vor fi luate în consideraţie nu numai reacţiile febrile tipice ci şi stările subfebrile sau afebrile cu orhită mai mult sau mai puţin pronunţată, făcînd 1—2 treceri oarbe.

Mult mai sigură este izolarea rickettsiilor de la căpușele capturate de pe cîinii din locuința bolnavului sau cu care acesta a venit în contact.

Diagnosticul serologic. *Reacția de fixare a complementului* (R.F.C.) cu antigen total sau corpuscular, ca și *reacția de aglutinare a rickettsiilor* (R.A.R.) sînt pozitive către sfîrșitul bolii. Ele permit deosebirea febrei butonoase de tifosul exantamtic de păduche și cel murin, și cu ajutorul unor antigene purificate, bine spălate, prin centrifugări repetate, o pot diferenția chiar de febra pătată a Munților Stîncoși. Aceste reacții sînt pozitive la titruri în general mici (1 : 20—1 : 320) însă ținînd seama de specificitatea lor, chiar titrurile cele mai mici pot fi considerate ca semnificative. Reacțiile specifice pozitive, persistînd mult în convalescență (uneori ani), nu permit diferențierea infecțiilor recente de cele vechi.

Este recomandabil ca prima R F.C. sau R.A.R. să fie făcută cît mai aproape de debutul bolii deoarece trecerea de la o reacție negativă la una pozitivă este foarte importantă pentru diagnostic.

Reacția Weil-Felix este constant pozitivă la bolnavii de febră butonoasă însă apare foarte tardiv — aproape totdeauna negativă în timpul bolii, devine pozitivă în convalescență — după 25—35 de zile. Titrul aglutinant este în general mic — 1 : 50 — 1 : 500, prima diluție (1 : 50) fiind considerată ca semnificativă pentru diagnostic.

Epidemiologie

Febra butonoasă este o boală sporadică întîlnită în Europa pe litoralul maritim — în special în lunile calde (iulie-august), cînd transmisia se face mai ușor (D. Combiescu). Vectorul obișnuit, căpușa de cîine *Rhipicephalus sanguineus* (și probabil multe alte specii de ixodide) este în același timp și rezervor de infecție din cauza capacității sale de a transmite infecția transovarian la descendenți. Boala poate exista astfel în natură fără a avea nevoie de un rezervor de infecție animal.

Nu există un vaccin eficient pentru profilaxia febrei butonoase.

Rickettsia australis și rickettsioza australiană de căpușe

Istoric. Rickettsioza australiană de căpușe (tifosul de căpușe de Queensland) a fost descrisă în 1946 în nordul regiunii Queensland (Australia) și aparține grupului de rickettsioze, cunoscut sub denumirea generală de „tifos de căpușe".

Agentul patogen al acestei boli, *Rickettsia australis*, (sin. *Ixodoxenus australis*), face parte din subgenul *C. Dermacentroxenus*.

Habitat. Infecția a fost evidențiată la marsupiale, rozătoare și la căpușe.

Caractere morfologice. *R. australis* seamănă ca morfologie și afinitate tinctorială cu *R. prowazeki*. Apare frecvent ca un microorganism cocoid sau elipsoidal, cu dimensiuni foarte mici, imobil, Gram-negativ, localizat atît intracitoplasmatic, cît și intranuclear.

Caractere de cultură. Crește sărac sau moderat în sacul vitelin al embrionului de găină în curs de dezvoltare la temperatura 32—35° și mai abundent pe culturi de agar-țesuturi, după metoda Zinsser.

Structură antigenică. Din suspensiile de *R. australis* s-au putut izola antigene solubile şi corpusculare, înrudite, dar nu identice cu cele ale rickettsiilor care produc alte febre pătate şi net diferite de cele ale *R. prowazeki*, *R. mooseri* şi *C. burneti*.

Boala la om. Incubaţia bolii durează 7—10 zile. Debut cu stare generală proastă, cefalee de intensitate progresivă. Frecvent afect primar — escară — ca în scrub-typhus, însoţită de adenopatii constante, splenomegalie, febră continuă sau remitentă cu o durată medie de 8 zile. Exantemul, foarte variabil ca aspect de la un caz la altul, este cu aspect papular generalizat pe corp şi extremităţi, respectînd uneori mîinile şi faţa.

Infecţia experimentală. Şoarecii şi cobaii sînt receptivi faţă de infecţia experimentală, ultimii făcînd o boală febrilă, cu reacţie scrotală, congestie intensă hemoragică a tunicilor şi splenomegalie uşoară. Şoarecii albi fac o infecţie inaparentă clinic.

Imunitate. Durata imunităţii la om nu este cunoscută. Cobaii vindecaţi de boală rămîn imunizaţi solid, cel puţin 8 luni după boală.

Diagnosticul de laborator

Diagnosticul bacteriologic. Izolarea agenţilor patogeni din sîngele bolnavului prin inoculare intraperitoneală la şoarece.

Diagnosticul serologic. Serurile de convalescent dau R.F.C. pozitive cu antigenul rickettsian omolog şi nu fixează complementul în prezenţa antigenelor epidemice, murine, butonoase şi de febre pătate. De asemenea, reacţia Weil-Felix este pozitivă la bolnavi, cu antigenele *Proteus* OX_{19} şi OX_2 şi negativă cu *Proteus* OXK.

Epidemiologie. Boala este prezentă într-o regiune cu o bogată populaţie animală de rozătoare şi marsupiale, foarte infestate cu trombiculide şi căpuşe.

Rezervorul animal este format din mai multe specii, între care cităm marsupialele: *Isoodon obesulus*, *Trichosurus vulpecula Johnstoni*, *Epyprymnus rufescens*, *Parameles nasuta* şi rozătorul *Uromys sherrini*.

Rickettsia akari şi rickettsioza variceliformă

(Sin.: Rickettsioza veziculoasă; Rickettsial pox; Gamasorickettsiosis vesiculosa)

Rickettsioza variceliformă este o boală febrilă, cu evoluţie de obicei uşoară, caracterizată printr-o leziune iniţială la locul înţepăturii artropodului infectant.

Agentul patogen al acestei boli, *Rickettsia akari* (sin: *Dermacentroxenus murinus Kulaghin*; *Gamasoxenus muris*) este o rickettsie din subgenul *Dermacentroxenus*.

Istoric. Identificată clinic în 1946 în S.U.A. (Greenberg) la bolnavi cu stări febrile asemănătoare clinic varicelei şi în U.R.S.S. (rickettsioza veziculoasă — *Gamasorickettsiosis vesiculosa*, Jdanov, Kulaghin).

Huebner (1946) i-a stabilit originea rickettsiană izolînd şi descriind agentul patogen.

Habitat. *R. akari* a fost izolată în natură de la şoarecele de casă şi de la ectoparazitul *Allodermanyssus sanguineus*. Este prezentă în sîngele şi ţesuturile cazurilor umane de boală.

Caractere morfologice. *Rickettsia akari* este asemănătoare cu *Rickettsia prowazeki*. Apare sub formă de bastonaşe mici, diplobacili sau cocobacili cu dimensiuni de 0,6 — 0,9 μ × 1,4μ foarte asemănătoare cu *R. rickettsi* care se multiplică intranuclear şi intracitoplasmatic.

Caractere de cultură. Nu creşte pe medii de cultură artificiale sau acelulare. Se dezvoltă uneori greu pe sacul vitelin. Se folosesc embrioni de 6 — 7 zile la temperatura de 35°.

Se înmulţeşte bine în interiorul celulelor stomacale şi în cavitatea celomică a păduchelui infectat intrarectal.

Structură antigenică. Din suspensiile de rickettsii cultivate pe sacul vitelin s-au izolat antigene specifice, care dau însă reacţii încrucişate cu antigenele preparate din rickettsiile grupului febrelor pătate.

Patogenitate. Patogenă pentru om, la care produce leziuni focale eritematoase la locul înţepăturii acarianului vector. Mai sînt întîlnite şi adenopatii, febră şi erupţie maculară, veziculară.

Infectează cobaiul, şoarecele alb şi şobolanul.

Boala la om. Incubaţia variază între 6 şi 23 de zile. Bolnavii prezintă o leziune iniţială la locul înţepăturii („afect primar") ca o papulă roşie, dură, rotundă sau ovalară, care evoluează spre veziculă şi escară. Febra apare la 2 — 7 zile de la apariţia leziunii iniţiale, şi durează 2 — 8 zile cu oscilaţii între 39° şi 40° şi este însoţită de celelalte simptome (frison, cefalee, stare generală rea). Erupţia cutanată apare după 1 — 6 zile de la debutul febrei, fiind formată din elemente generalizate, care din stadiul maculo-papulo-eritematos devin veziculare şi apoi se acoperă de cruste negre care cad fără a lăsa semne.

Infecţia experimentală. *Şoarecii* inoculaţi intraperitoneal prezintă după 5 — 9 zile o stare de torpoare cu zbîrlirea părului şi tahipnee care durează 9 — 13 zile, fiind urmată de moarte mai ales după adaptarea tulpinii.

La necropsie se observă acumulare de lichid peritoneal sanguinolent (pînă la 2 ml la un şoarece de 15 — 20 g) cu ganglionii limfatici măriţi, hepatomegalie şi splină neagră — mărită (8 — 10 ori volumul normal).

Pe frotiuri se observă prezenţa rickettsiilor în nucleul şi citoplasma celulelor mononucleare parazitate şi în afara lor.

Inocularea intracerebrală determină apariţia mai precoce a semnelor de boală şi un procent mai mare de mortalitate.

Trecerile pot fi făcute cu ficat, splină, creier şi ganglioni limfatici.

Cobaii inoculaţi intraperitoneal fac boala după o incubaţie de 1—2 săptămîni (4 — 6 zile la tulpinile adaptate), cu o stare febrilă caracterizată prin remisiuni cu o durată de 3 — 5 zile. Cobaii masculi fac o reacţie scrotală care apare a 4-a zi de boală, cu periorhită şi aderenţa testiculelor la tunica vaginală care este îngroşată şi congestionată intens. Rickettsiile pot fi puse în evidenţă pe frotiuri din peritoneu şi tunica vaginală.

Trecerile ulterioare pot fi făcute cu creier, splină, ficat, sînge şi mai ales cu tunica vaginală.

Imunitate. Nu există date asupra imunităţii la om. Cobaii vindecaţi de rickettsioza variceliformă sînt imuni la infecţia cu tulpinile omologe şi prezintă imunitate încrucişată parţială sau completă faţă de alte rickettsioze din grupul febrelor pătate.

Diagnosticul de laborator

Diagnosticul bacteriologic. Izolarea agentului patogen de la bolnavii aflaţi în perioada febrilă a bolii se face inoculînd 0,5 — 1 ml sînge defibrinat imediat după recoltare, intraperitoneal la şoareci albi sau 4 — 5 ml la cobai.

Cobaii fac boala în cazul izolării primare de la bolnav după o incubaţie prelungită (14 zile), uneori fiind necesare cîteva treceri oarbe.

În unele cazuri, *R. akari* poate fi izolată prin inocularea directă a sîngelui de bolnav în sacul vitelin al embrionului de găină.

Diagnosticul serologic. Reacţia de fixare a complementului (R. F. C.) cu antigen de *R. akari* este pozitivă la bolnavi din primele zile atingînd valori cuprinse între 1 : 128 şi 1 :256.

Reacţia Weil-Felix cu antigen de *Proteus* OX_{19}, OX_2 şi OXK este negativă.

Epidemiologie

Este semnalată pînă în prezent în S. U. A. (Rickettsial pox) şi U. R. S. S. (rickettsioza veziculoasă-*gamasorickettsiosis vesiculosa*). Infectează în natură şoarecele de casă (*Mus musculus*), iar după autorii sovietici şi şobolanul de casă (*Rattus norvegicus*). Transmisia la om se face prin înţepătura unui acarian ectoparazit hematofag al acestor rozătoare, *Allodermanyssus sanguineus*.

Boala are un caracter urban şi poate fi observată în tot cursul unui an, cu o perioadă de incidenţă crescută în lunile de primăvară-vară, ca rezultat al unei activităţi crescute a vectorului.

Nu există în prezent un vaccin care să asigure profilaxia specifică a acestei rickettsioze.

Rickettsia tsutsugamushi şi febra tsutsugamushi

(Sin.: febra fluvială de Japonia, tifosul de lăstăriş (scrub-typhus) tifos tropical, tifos rural, rickettsioza tsutsugamushi)

Grupul tsutsugamushi cuprinde în realitate 3 varietăţi locale ale aceleiaşi boli: *febra tsutsugamushi de Japonia*, *scrub-typhus de Malaya*, *mite-typhus de Sumatra*.

Rickettsioza tsutsugamushi sau scrub-typhus este o boală infecţioasă acută, produsă de *Rickettsia tsutsugamushi* (*R. orientalis*), transmisă la om de acarieni şi caracterizată prin afect primar la locul înţepăturii, erupţie maculo-papuloasă şi prezenţa în sînge a aglutininelor faţă de Proteus OXK.

Rickettsia tsutsugamushi (sin. *R. orientalis*) agentul patogen al febrei tsutsugamushi face parte din subgenul *B. Zinssera*.

Istoric. Cunoscută în China încă din veacul al III-lea î.e.n., a fost descrisă pentru prima oară în anul 1810 de Hashimoto şi apoi studiată de numeroşi cercetători.

Habitat. Este găsită în natură la rozătoare sălbatice, inclusiv şobolani de casă şi de cîmp, şoareci, probabil la unele păsări la care infecţia poate fi persistentă. Agentul este prezent şi la artropodele vectoare (trombiculide) la care trece transovarian la generaţia următoare La om este întîlnit la locul afectului primar şi în ganglionii adiacenţi.

Caractere morfologice. *Rickettsia tsutsugamushi* este un parazit obligat intracelular, localizat în citoplasma celulelor infectate, polimorf, apărînd cel mai frecvent elipsoidal sau baciliform, sub formă de mici diplococi sau bacili scurţi, cu o lungime de 0,3 — 0,5μ şi o lăţime de 0,2 — 0,4μ, colorat bipolar.

Caractere de cultură. *R. tsutsugamushi* se dezvoltă bine pe sacul vitelin şi membrana chorioalantoidă a oului embrionat, ca şi în diferite tipuri de culturi de ţesuturi care conţin celule de mamifere, pe testiculele de iepure şi celulele endoteliale ale membranei Descemet a ochiului la iepure. Embrionii inoculaţi mor după 6 — 10 zile fără lezuni caracteristice. Este găsit totdeauna intracitoplasmatic şi niciodată intranuclear.

Rezistenţa este relativ slabă. Suspensiile de ţesuturi infectate sînt inactivate în cîteva ore de formol 0,1 % sau fenol 0,5 %. Moare în 10 minute, la 50°. Se păstrează bine în condiţii de laborator, liofilizare sau conservare la — 70°.

Structura antigenică. Prin metoda extracţiei cu eter a ţesuturilor viteline infectate s-au putut izola antigene utilizabile pentru serodiagnostic. Este singura specie cunoscută de rickettsii, care, în urma tratamentului cu eter al sacilor vitelini, rămîne în interfază. Tulpinile izolate de la bolnavi şi acarieni sînt eterogene din punct de vedere antigenic, putînd fi clasate în mai multe serotipuri distincte.

Caractere de patogenitate. *R. tsutsugamushi* este patogenă pentru om, maimuţă, cobai, hamster, şobolan, şoarece, iepure (prin infecţie intraoculară).

Există o mare variaţie de virulenţă a diferitelor tulpini pentru animalele de laborator. În timp ce unele tulpini produc infecţii cu mare mortalitate, altele infectează foarte greu.

Boala la om. Incubaţia durează 6—21 de zile, în general 10—12 zile, după care urmează debutul brusc, cu febră, frison, cefalee severă, limfoadenopatie generalizată, moderată. Leziunea primară sau escara apare în special în axilă sau în regiunea taliei, la început ca o leziune eritematoasă indurată, cu diametru de 1 cm, acoperită de o veziculă care apoi ulcerează şi se acoperă de o crustă neagră. Exantemul maculo-papular apare în ziua a 5-a şi a 8-a şi durează cîteva ore pînă la cîteva zile. La foştii bolnavi, agentul patogen poate persista în ganglionii limfatici mai mult de un an.

Infecţia experimentală. *Şoarecele alb* este animalul cel mai potrivit pentru cercetări de laborator şi de diagnostic.

Boala începe după 7 — 8 zile de la inocularea intraperitoneală cu o suspensie de *R. tsutsugamushi* şi evoluează cu tumefiere abdominală, edem subcutanat al peretelui abdominal şi moarte. La necropsie se constată exsudat sero-fibrinos abundent în cavitatea peritoneală şi pleură, splenomegalie şi zone de consolidare hemoragică în plămîn.

Rickettsiile pot fi evidenţiate cel mai bine în amprentele de splină şi peritoneu.

Infecţia cu *R. tsutsugamushi* se poate produce de asemenea la cobai, la care evoluează ca o boală febrilă şi la iepure prin inoculări intraoculare şi intratesticulare.

Imunitate. Imunitatea conferită de infecţia cu R. *tsutsugamushi* este mai puţin solidă decît cea din tifosul exantematic şi febrele pătate şi este probabil influenţată de diferenţele antigenice între tulpini.

Reîmbolnăvirile sînt destul de frecvente şi apar la cîţiva ani după primoinfecţie.

Imunitatea faţă de tulpinile omologe de *R. tsutsugamushi* durează cîţiva ani, iar cea faţă de tulpinile heterologe cîteva luni.

Diagnosticul de laborator

Diagnosticul bacteriologic se face prin izolarea rickettsiilor din sîngele bolnavului sau din ţesuturi la necropsie, prin inoculare intraperitoneală la şoarece.

Diagnosticul serologic cu antigene specifice rickettsiene are o valoare limitată — din cauza heterogenităţii tulpinilor.

Mult mai folositoare este reacţia nespecifică Weil-Felix, care este pozitivă în mod caracteristic numai cu tulpina OXK de *B.proteus*, la începutul săptămînii a doua de boală, şi care se negativează după 5 — 6 săptămîni. Titrul 1/160 este considerat ca semnificativ pentru diagnostic.

Epidemiologie

Febra tsutsugamushi este răspîndită în sud-estul Asiei, India şi nordul Australiei. Infecţia este transmisă de la rezervorul animal, reprezentat de diferite rozătoare sălbatice, la om în perioadele în care vectorii *Trombicula akamushi* şi *T. deliensis* sînt foarte abundenţi-respectiv vara în regiunile temperate şi în sezonul ploios la tropice. Boala este transmisă numai prin intermediul larvelor, care sînt parazite pe vertebrate.

Coxiella burneti şi febra Q

(Sin.: febra de Queensland, rickettsioza pulmonară, pneumorickettsioza, tifos pulmonar)

Febra Q este o rickettsioză specifică, comună omului şi diferitelor animale domestice şi sălbatice şi care la om evoluează — de obicei, fără exantem, cu rickettsiemie şi pneumonie interstiţială.

Agentul patogen al febrei Q, *Coxiella burneti*, are o serie de proprietăţi care o deosebesc net de celelalte rickettsii : este filtrabilă prin filtre bacteriene ; foarte rezistentă la agenţi fizici şi chimici ; nu este dependentă de transmiterea prin artropode de la animal la om, nu produce exantem spre deosebire de celelalte rickettsioze şi nici nu produce anticorpi pentru germenii din grupul *Proteus* în reacţia Weil-Felix în timpul bolii, la om.

Aceasta justifică încadrarea sa într-un gen aparte *Coxiella* şi numai puţini autori mai păstrează încă denumirea de *Rickettsia burneti*.

Istoric. Febra Q a fost identificată de Derrick (1935) cu ocazia unei epidemii de origine necunoscută, printre lucrătorii din abatoare, în regiunea Queensland din Australia.

Agentul patogen izolat cu această ocazie a fost numit în 1939 *Rickettsia burneti*, după numele lui Burnet, ale cărui cercetări au permis clasificarea lui între rickettsii. În acelaşi timp, Davis şi Cox (1938) au izolat de la căpuşă *Dermacentor andersoni* un microorganism pe care din cauza capacităţii sale de a traversa filtrele bacteriene l-au numit *Rickettsia diaporica*, identic cu primul şi considerat mai tîrziu de Philip (1948) ca prototip pentru un nou gen, *Coxiella*.

Habitat. *Coxiella burneti* este foarte răspîndită în natură, fiind izolată de la peste 20 de specii de căpuşe infectate natural, de la unele diptere înţepătoare, de la animale domestice (bovine, ovine, caprine, cai şi cîini etc.), om, păsări domestice şi sălbatice, animale sălbatice mici (boală cu focare naturale).

Morfologie. *C. burneti* este un microorganism parazit, obligat intracelular, cu caracterele morfologice ale rickettsiilor, avînd forma de mici bastonaşe pleomorfe, uneori lanceolate, colorate bipolar şi care prezintă uneori forme diplobacilare, filamentoase, segmentate, cu dimensiuni de aproximativ 0,25 μ × 0,4 — 0,5μ. Greu colorabil cu coloranţii de anilină, Gram-negativ, se colorează în roşie-viu prin metoda Macchiavello şi roşu purpuriu cu Giemsa în coloraţia Graçian. Apare sub formă de grămezi de obicei în citoplasma celulelor endoteliale şi seroase, ca de exemplu cele din peritoneu, ca şi în exsudatul peritoneal la şoarece şi la alte animale de laborator.

Caractere de cultură. *C. burneti* nu se dezvoltă pe medii acelulare. Creşte abundent pe medii cu celule vii şi în special în sacul vitelin al embrionului de găină în curs de dezvoltare, pe care dă cantităţi foarte mari de rickettsii (pînă la 10^{10} — 10^{11} unităţi infectante pe 1 g de ţesut vitelin). Culturile se fac pe ouă cu embrioni în vîrstă de 6 — 7 zile, care sînt inoculaţi în sacul vitelin. Moartea embrionului se produce după 4 — 5 zile de incubare la 35°. Ţesutul vitelin recoltat de la embrioni imediat după moarte sau în faza agonică este folosit pentru subculturi, pentru întreţinerea tulpinii în laborator, ca şi pentru prepararea de vaccinuri şi produse de diagnostic.

Rezistenţa la acţiunea agenţilor fizici şi chimici este extrem de mare. Astfel, *C. burneti* rămîne vie în laptele steril 45 de zile la temperatura camerei, în brînza de vacă 17 — 46 de zile, în sînge, coagulat şi păstrat la temperatura camerei, cel puţin 2 ani, în carne 30 de zile, pe ţesături în stare uscată 40 de zile, în apă sterilă 160 de zile.

Căldura o inactivează rapid la 100°, în 30 — 40 de minute la 63° şi în 20 de minute la 74°.

Rezistă 96 de ore la acţiunea formolului 0,5% şi este inactivată în 72 de ore de formol 1% şi în 5 minute de formol 2%.

Insensibilă la acţiunea sulfamidelor şi penicilinei, foarte sensibilă la acţiunea cloromicetinei, aureomicinei şi teramicinei.

Structura antigenică. În prezenţa eterului etilic, *C. burneti* ca şi celelalte rickettsii liberează, pe lîngă un antigen corpuscular legat de celula rickettsiană, o fracţiune antigenică solubilă care reprezintă aproximativ 30% din antigenul total.

Antigenul solubil rickettsian poate fi de asemenea separat din suspensiile de *C. burneti* purificate cu ajutorul vibraţiilor ultrasonice. El determină apariţia de anticorpi la cobai şi conferă animalelor imunizate o protecţie cel puţin parţială faţă de inocularea de probă cu rickettsii vii.

Nu conţine un factor antigenic comun cu bacteriile genului *Proteus* şi ca atare nu dă reacţii Weil-Felix pozitive.

Fiset şi Stoker au descris o variaţie de fază, corespunzînd formei în care *C. burneti* se găseşte în condiţii naturale şi la animalele infectate experimental (faza I) şi celei obţinute prin adaptare la om (faza a II-a).

Variaţia de fază la *C. burneti*, respectiv trecerea de la faza I la faza a II-a, poate fi explicată prin pierderea aproape totală, în cursul adaptării la ou, a unui component antigenic de suprafaţă, cu capacitate slabă de combinare cu anticorpi, care maschează un al doilea component puternic antigenic.

Patogenitate. În afară de speciile receptive la infecţia naturală (om, bovine, ovine, caprine, cabaline, diferite rozătoare, păsări domestice şi sălbatice) numeroase specii de animale de laborator sînt sensible la infecţia cu *C. burneti*. La animalele mari (vaci, oi, capre etc.) se observă o afinitate particulară a agentului patogen pentru glanda mamară şi placentă. Infecţia de obicei atenuată sau inaparentă este brusc reactivată de starea de graviditate şi se însoţeşte *post partum* de o eliminare masivă a agenţilor patogeni prin lapte, placentă, lichide şi ţesuturi fetale etc.

Caracteristic, pentru infecţia cu *C. burneti* atît la animalele infectate natural, cît şi la cele infectate experimental este persistenţa îndelungată a agentului patogen în ţesuturile gazdei în special în glanda mamară, ficat, splină, rinichi etc.

Persistenţa agentului patogen în organism în prezenţa anticorpilor s-ar datora faptului că, în organismul animalelor convalescente, *C. burneti* s-ar găsi într-o formă inaccesibilă anticorpilor, „faza I'' determinată de prezenţa pe suprafaţa rickettsiilor a unui înveliş polizaharidic slab antigenic, care ar împiedica antigenul proteic să se combine cu anticorpul omolog.

La tulpinile bine adaptate la cultivarea pe sacul vitelin acest înveliş dispare şi agentul patogen trece în „faza a II-a'' în care este accesibil anticorpilor, atît în testele de neutralizare, cît şi în reacţiile serologice de diagnostic.

Boala la om. Apare cel mai adesea cu o evoluţie clinic tipică, dar poate evolua inaparent sau cu o simptomatologie nespecifică. După o incubaţie de 14—26 de zile (în medie 19 zile), se observă un debut de obicei brusc, cu febră, cefalee severă, mialgii, frison. Febra durează 2—14 zile cu oscilaţii între 38° şi 40°, uneori de tip oscilant şi este însoţită de cefalee intensă, tuse uscată, necaracteristică şi durere toracică. Localizarea pulmonară care este şi cea mai frecventă, caracterizează infecţiile produse pe cale respiratorie, poate lipsi în cazul altor modalităţi de contaminare (exemplu pe cale digestivă).

Prin urmare, deşi febra Q este considerată ca o afecţiune pulmonară, ea este de fapt o infecţie generală în care localizările pulmonare pot lipsi.

Caracteristic pentru îmbolnăvirea aparatului respirator este faptul că semnele fizice sînt obișnuit minime sau absente, chiar în prezența unui proces pneumonic masiv. Modificările pulmonare de tipul pneumoniei virotice sau atipice pot fi puse în evidență prin examen radiologic în circa 40—60% din cazuri și sînt prezente chiar din ziua a întîia — a doua de boală, persistă 2—5 săptămîni, ele apărînd chiar în cazurile foarte ușoare sau inaparente.

Infecția experimentală. *Cobaii* infectați cu produse patologice, care conțin *C. burneti* fac după 2—10 zile (în medie 4—6 zile) o reacție febrilă, continuă, cu durata de 2—8 zile cu 40—40°,5, însoțită de inapetență, păr zbîrlit și pierdere în greutate. Curba febrilă poate avea un aspect caracteristic, bifazic, cu ascensiune termică de 40—42° timp de 1—2 zile, urmată de o revenire la normal pentru o zi, după care crește din nou cîteva zile în platou. Boala la cobai poate evolua și complet inaparent.

În cazul unor tulpini particular virulente, cobaiul poate face o boală mortală.

Animalele sacrificate prezintă o splenomegalie foarte marcată (de 2—6 × mărimea normală) cu perisplenită, tumefierea ganglionilor mezenterici și inghinali și leziuni focale mici, granulomatoase în toate țesuturile, constînd din endotelioză și infiltrate perivasculare de celule din seria limfocitară, monocite și fibroblaști. Cobaii trecuți prin boală prezintă reacții serologice pozitive (R.F.C., care ajung titrul maxim după 21—30 de zile de la apirexie) și sînt imuni la inocularea de probă cu o tulpină de *C. burneti* de colecție.

Pentru întreținerea tulpinii pe cobai se fac treceri succesive cu sînge recoltat în perioada febrilă sau suspensie de splină și suprarenală.

Șoarecii infectați cu *C. burneti* fac o infecție inaparentă. După inocularea intraperitoneală, rickettsiile pot fi evidențiate în amprentele de splină și ficat sau în exsudatul peritoneal, la o parte din animalele sacrificate după 8—10 zile de la inoculare. Deși infecția respectivă evoluează inaparent, rickettsiile se multiplică abundent, astfel încît infecțiozitatea splinei de șoarece, măsurată pe cobai, dă titruri foarte ridicate (10^{-8} sau peste).

Imunitate. Nu există date precise asupra imunității la om, dar pare să fie destul de solidă. Animalele de laborator vindecate după infecția cu o tulpină de *C. burneti* capătă rezistență la reinfecția cu o tulpină omologă. Totuși, această rezistență este relativă, deoarece poate fi învinsă prin inocularea unei doze masive. Animalele care au făcut febră Q nu sînt rezistente față de infecția cu alte rickettsii.

Diagnosticul de laborator

Diagnosticul bacteriologic. Izolarea *C. burneti* de la bolnav sau de la animalele infectate se face prin inoculare la cobai pe cale intraperitoneală pentru produsele bacteriologice sterile, și pe cale subcutanată sau intramusculară pentru cele contaminate secundar, la care adaugă în prealabil penicilină 1 000—5 000 u/ml. Produsele patologice folosite obișnuit sînt:

— sînge de bolnav recoltat în perioada febrilă (3—4 ml sau cantitatea corespunzătoare de cheag, debarasat de ser, care conține anticorpi neutralizanți);

— lapte 3—5 ml (+ penicilină 1 000—5 000 u/ml), recoltat după spălarea ugerului cu apă şi alcool de 70°;

— puroi, dejecţiuni sau produse în stare de putrefacţie care se inoculează numai după debarasarea de flora asociată, prin diluarea în ser fiziologic sau bulion, ser de cal, filtrare prin Seitz EK şi tratare cu penicilină. Întrucît filtrarea sărăceşte produsul în rickettsii, se recomandă inocularea unei cantităţi mai mari de filtrat;

— placentă, recoltată în maximum 10 ore de la eliminare. Se inoculează 0,5—1 g ţesut cotiledonar, provenit din cel puţin 5 fragmente de cotiledoane din regiuni diferite + penicilină.

— artropode, circa 50 de exemplare, dezinfectate în baie de eter + alcool, spălate în apă distilată sterilă şi broiate în 10—15 ml bulion sau ser fiziologic. Se inoculează 1—3 ml intraperitoneal după adăugarea de penicilină.

Izolarea prin inocularea directă în sacul vitelin al embrionului de găină este posibilă numai pentru produsele necontaminate cu bacterii. Se inoculează de obicei 0,5 ml sînge de bolnav, defibrinat prin agitare în flacon cu perle, la embrioni de 7 zile, urmat de incubare la 35—37°. Necesită în cele mai multe cazuri 1—3 treceri oarbe, după care rickettsiile pot fi evidenţiate pe frotiurile de sac vitelin colorate Macchiavello.

Diagnosticul serologic. Reacţia de fixare a complementului se practică totdeauna după tehnica standard descrisă anterior, folosind ca antigen o suspensie concentrată şi purificată (antigen corpuscular) de *C. burneti* obţinută din culturi pe sacul vitelin al embrionului de găină.

R.F.C. devine pozitivă în ziua a 4-a—a 7-a de la debutul bolii, atinge un titru maxim aproximativ a 20-a zi şi persistă la un titru mult scăzut cîteva luni şi chiar cîţiva ani. La sfîrşitul primei săptămîni de boală sînt pozitive numai 9—13% din reacţii, la sfîrşitul săptămînii a doua 75%, iar în săptămîna a 3-a, 97%.

Titrul mediu creşte de la 1 : 8 (săptămîna I) la 1 : 32 (săptămîna a II-a) 1 : 128 (săptămîna a III-a) pentru a rămîne constant în săptămîna a IV-a — după care scade lent (Zarnea, N. Alexandrescu şi colaboratorii).

Antigenul *C. burneti* poate da reacţii nespecifice, însă tranzitorii, cu serul bolnavilor de psoriasis, meningoradiculită, ascaridioză, sifilis ereditar, ca şi cu serul bolnavilor de pneumonie atipică virotică.

Reacţia de aglutinare a rickettsiilor (R.A.R.) foloseşte ca antigen o suspensie de *C. burneti* obţinută prin concentrarea şi purificarea prin extracţii repetate cu eter şi centrifugări diferenţiale a unei suspensii obţinută din culturi pe sacul vitelin sau splină de şoarece.

R.A.R. pozitivă este mărturia unui contact anterior cu *C. burneti* fără a da indicaţii — în absenţa datelor clinice sau a altor semne de laborator — asupra legăturii cu o infecţie de dată recentă. Este de asemenea de menţionat că reacţiile pozitive nu indică starea de eliminator de rickettsii.

Reacţia opsonofagocitară, recomandată de Victor (1952), se practică cu sînge heparinat sau cu ser sanguin şi leucocite de om normal. Reacţia se consideră pozitivă dacă 94% din polimorfonucleare au fagocitat rickettsii. Este o reacţie foarte sensibilă, dar greu de interpretat.

Reacţia de sensibilizare antiglobulinică. Coombs şi Stoker au arătat că, în multe cazuri, titrul anticorpilor aglutinanţi este mult mai mic sau chiar negativ în opoziţie cu cel fixator de complement care poate fi pozitiv la titruri foarte ridicate (1/160—1/320). Aceste cazuri pot fi depistate prin testul de sensibilizare antiglobulinică Coombs sau prin reacţia de conglutinare directă (Barber, 1955).

Epidemiologie

Febra Q apare obişnuit sub formă de cazuri sporadice — la intervale neregulate de timp — legate de un izvor de infecţie animal sau în legătură cu produse de origine animală. Pe acest fond de endemicitate se grefează periodic izbucniri epidemice scurte — care apar brusc — dînd un număr variabil de cazuri — şi se repetă de una sau mai multe ori — după oarecare interval de timp, fără tendinţă de extindere teritorială.

Izvorul de infecţie în febra Q este reprezentat de diferite specii animale ca: bovine, ovine, caprine, cabaline, porcine, cîini, rozătoare, păsări domestice şi peridomestice.

Animalele mari fac, în general, o infecţie generalizată, neexteriorizată clinic, care poate persista luni sau ani şi care este reactivată de starea de graviditate şi, în special, spre sfîrşitul sarcinii cînd rickettsiile se multiplică în placentă în număr enorm. În momentul fătării, agentul patogen este eliminat foarte activ din placentă, lichide şi ţesuturi fetale, lapte, urină şi materii fecale — creînd astfel condiţii de transmitere la alte animale şi la om. Transmiterea interumană este posibilă în special prin spută şi secreţii nazofaringiene, dar nu este de importanţă esenţială.

Febra Q face parte din bolile cu focalitate naturală. În ţara noastră au fost semnalate focare naturale în jurul celor endemoenzootice cu prezenţa infecţiei la arici (*Erinaceus europaeus* L), coţofană (*Pica caudata*) şi uliu (*Buteo buteo*) (G. Zarnea, N. Alexandrescu şi colaboratorii).

Transmisiunea prin intermediul artropodelor vectoare — posibilă la animale, nu a fost semnalată la om.

În ţara noastră a fost semnalată prezenţa infecţiei naturale la căpuşa de cîine (*Rhipicephalus sanguineus*), musca de oaie, (*Melophagus ovinus*) şi musca de cal (*Hipobosca equina*). La căpuşe, infecţia se transmite transovarian de la o generaţie la alta.

Profilaxia specifică. Vaccinul contra febrei Q, preparat pe sacul vitelin după metoda Cox a dat rezultate foarte încurajatoare în S.U.A. şi U.R.S.S. la persoanele expuse în mod deosebit riscului de infectare. S-a semnalat totuşi prezenţa unor reacţii postvaccinale, locale sau generale, la un număr destul de însemnat de vaccinaţi, care pot fi mult reduse sau chiar complet evitate, dacă se foloseşte un vaccin foarte purificat. S-au obţinut rezultate foarte bune cu 2 injecţii vaccin, respectiv 0,5 şi 1 ml la interval de 2 săptămîni.

Rickettsia quintana şi febra de tranşee

(Sin.: febra de Wolhynia, febra cvintană, febra de 5 zile)

Febra de tranşee este o boală infecţioasă benignă, de natură rickettsiană, caracterizată din punct de vedere clinic prin accese febrile scurte, de tip recurent, care apar în general la interval de 5 zile.

Agentul patogen *Rickettsia quintana* (sin. : *R. wolhynica*, *R. weigli*, *Wolhynia quintanae*) face parte din subgenul *Rochalimaeae*.

Istoric. A fost descrisă ca o entitate în timpul primului război mondial (1914—1918), cînd a provocat un număr de peste 1 milion de îmbolnăviri.

În aceeaşi perioadă s-a stabilit şi etiologia rickettsiană (Töpper, 1916).

Habitat. *R. quintana* este prezentă în intestinul păduchelui uman de corp şi cap, pentru care nu este patogenă.

Caractere morfologice. *R. quintana* se deosebeşte morfologic de *R. prowazecki*, fiind formată din elemente mai groase şi mai scurte, care se colorează mult mai intens cu coloranţii de anilină.

Apare sub formă de microorganisme cocoide sau elipsoidale de 0,3—0,5 μ, frecvent aşezate în perechi şi colorate bipolar.

Spre deosebire de *Rickettsia prowazecki*, care este un parazit intracelular în interiorul celulelor epiteliale ale stomacului de păduche, *R. quintana* se găseşte totdeauna extracelular, în lumenul tractului digestiv al păduchelui infectat sau pe suprafaţa celulelor epiteliale ale acestui tract.

Caractere de cultură. *R. quintana* nu poate fi cultivată în culturi de ţesuturi, în sacul vitelin al oului embrionat sau pe medii artificiale acelulare. Se dezvoltă numai în organismul păduchelui infectat pe cale intraanală sau hrănit pe bolnavi, aflaţi în faza de rickettsiemie.

Rickettsiile apar în intestinul păduchelui după 6—15 zile şi se elimină toată durata vieţii insectei, care nu este scurtată prin această infecţie.

Rezistenţa la agenţi fizici şi chimici este mare.

În stomacul uscat al păduchilor infectaţi se păstrează 2 ani, iar în fecalele lor, la temperatura camerei, 10 zile.

Este distrusă după 30 de minute la 60° căldură umedă şi după 20 de minute la 80°, căldură uscată. La lumina solară şi desicaţie rezistă 4 luni.

Structura antigenică. *R. quintana* nu posedă un antigen comun cu *B. proteus* şi nu dă reacţii Weil-Felix pozitive.

Patogenitate numai pentru om şi maimuţe superioare (*Macacus rhesus*).

Boala la om. Perioada de incubaţie variază între 14 şi 30 de zile. Febra de transee, este caracterizată prin debut brusc, frison, cefalee, splenomegalie, dureri cu intensitate şi localizări foarte diferite în special tibiale („febra tibialgică''), exantem macular sau papulos pe torace, abdomen şi spate. Febra apare caracteristic sub formă de accese cu caracter recurenţial, la interval de 5 zile. Boala este de asemenea caracterizată prin recăderi care pot apărea chiar după 2—3 ani după atacul iniţial.

Infecţia experimentală. Nu există animal de laborator sensibil faţă de infecţia cu *R. quintana*. O mică proporţie din cobaii infectaţi fac o febră foarte moderată de tip ondulant, care poate dura mai multe săptămîni dar care nu poate fi transmisă la alte animale. Agentul patogen este cultivat şi păstrat în laborator numai prin infectarea intestinală a păduchelui de corp.

Diagnosticul de laborator

Diagnosticul bacteriologic nu poate fi făcut decît prin demonstrarea prezenţei *R. quintana* extracelulară în intestinul păduchilor, hrăniţi direct pe bolnavi, sau prin epidermomembrană cu sînge citratat, recoltat de preferinţă de la bolnavi aflaţi în timpul accesului febril.

Diagnosticul serologic este greu de practicat. R.F.C. cu antigene din intestin de păduche dă rezultate foarte variabile şi, uneori, nespecifice.

Epidemiologie

Unicul izvor de infecţie în natură este omul — care poate infecta păduchele de corp şi de cap în perioada febrilă şi în unele cazuri, în care infecţia persistă cronic, timp îndelungat (300—442 zile) după debutul bolii. Păduchii infectaţi elimină virusul prin dejecţii 25—60 de zile. Transmiterea la om se face probabil după acelaşi mecanism, ca şi în tifosul exantematic.

Genul Candida

Conf. Dr. V. Bîlbîe

Integrarea într-un volum de bacteriologie medicală a unui capitol care aparține micologiei, reflectă schimbările produse în patologia infecțioasă, consecutiv extinderii antibioterapiei și corticoterapiei, precum și necesitatea ca laboratorul de microbiologie să participe efectiv la diagnosticul infecțiilor candidomicotice. Microorganismele din genul *Candida* sînt importante prin frecvența crescută și gravitatea infecțiilor pe care le determină. Progresul realizat considerabil în cunoașterea biologiei acestor microorganisme, îngăduie folosirea de tehnici corespunzătoare, pentru izolarea și identificarea candidelor nu numai în infecțiile pielii și mucoaselor, dar și în diverse localizări viscerale, în infecțiile generalizate etc.

Istoric. Cunoașterea levurilor care determină infecții umane este anterioară epocii pasteuriene. În 1838, Langenbeck semnalase existența levurilor în leziunile de „muguet", iar în 1853, Ch. Robin descria specia *Candida albicans*, sub denumirea *Oidium albicans*.

Deși la cel de al III-lea Congres internațional de microbiologie (1939) s-a stabilit nomenclatura genului *Candida*, totuși persistă folosirea unor denumiri improprii ca „*monilia*", „moniliază", „oidium" etc. Aceasta se explică prin fluctuațiile de clasificare și nomenclatură și prin proporțiile neobișnuite ale sinonimiei (peste 170 de termeni sinonimi pentru specia *C. albicans*). „Ciupercile din genul *Monilia* sînt filamentoase, au miceliu adevărat cu sporofori și lanțuri de conidii bazipete" (Brumpt). Ciupercile din genul *Oidium* sînt de asemenea filamentoase, au conidiofori și conidii în lanțuri și nu cresc pe mediile de cultură artificiale. Candidele sînt ciuperci unicelulare care se înmulțesc prin înmugurire. Termenul de moniliază desemnează în fitopatologie bolile fructelor în care ciupercile din genul *Monilia* formează scleroți.

Pentru definirea și alcătuirea genului *Candida*, lucrarea cercetătoarei C. M. Berkhout (1923), precum și lucrările lui Langeron, Diddens și Lodder, Lodder și Kreger-Van Rij etc. au o însemnătate fundamentală.

În genul *Candida* sînt cuprinse levuri anascosporate, „care se înmulțesc exclusiv prin înmugurire, nu dau niciodată ascospori, nu produc pigment carotenoid, nu formează niciodată artrospori sau conidii adevărate, prezintă un aparat filamentos verticilat sau pseudomiceliu format numai din blastospori şi avînd rolul de aparat sporifer" (Langeron şi Guerra, 1938). Candidele nu formează balistospori.

După vechile clasificări, genul *Candida* face parte din clasa fungi imperfecţi (grupare arbitrară a unor organisme foarte variate, care au drept caracter comun ignorarea încă, a modului de reproducere).

Clasificarea cea mai corespunzătoare şi mai recentă (Lodder) grupează genul *Candida* în familia *Cryptococcaceae* subfamilia *Cryptococcoideae* (levuri care nu formează ascospori şi nici balistospori). Genul *Candida* cuprinde numeroase specii saprofite şi patogene pentru om şi animale. Specia *Candida albicans* prezintă cea mai mare importanţă. Celelalte specii principale sînt următoarele:

— *Candida intermedia*;
— *Candida lipolytica*;
— *Candida macedoniensis*;
— *Candida para krusei*;
— *Candida pelliculosa*;
— *Candida pulcherrima*;
— *Candida rugosa*
— *Candida zeilanoïdes*;
— *Candida tropicalis*;
— *Candida pseudotropicalis*;
— *Candida stellatoidea*;
— *Candida krusei*;
— *Candida guillermondi*;
— *Candida brumpti*;
— *Candida curvata*.

Habitat. Numeroase cercetări confirmă prezenţa candidelor, pe cele mai variate substraturi din natură; legume, fructe (citrice, struguri, curmale etc.), seminţe de cereale, trestie de zahăr, frunze de ceai, resturi vegetale, lapte, brînză, smîntînă, etc. Candidele au fost izolate din sol, din probe de turbă, într-o proporţie mai ridicată din solul tratat cu îngrăşăminte animale şi din solul livezilor etc. Din aerul oraşelor au fost izolate unele specii de candide. *Candida albicans* n-a fost izolată, decît din aerul încăperilor de spital în care se aflau bolnavi cu candidomicoze. S-au izolat de asemenea candide de pe obiecte casnice, veselă, jucării şi obiecte de lenjerie. Un număr de 5–6 specii (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei*, *C. stellatoidea*, *C. intermedia* etc.) sînt frecvent izolate din cavitatea bucală, faringiană, din conţinutul intestinal, din cavitatea vaginală, de pe pielea mîinilor, picioarelor, a suprafeţelor de flexiune etc. la indivizi clinic sănătoşi. Frecvenţa izolării creşte cu vîrsta sau cu anume stări fiziologice (graviditate, menstruaţie, perioada de alăptare). Numeroasele cercetări demonstrează frecvenţa crescută a candidelor în sputa şi conţinutul intestinal al bolnavilor de tuberculoză pulmonară, mai ales la cei cu bronşiectazii sau trataţi cu antibiotice şi hormoni corticosteroizi. Candidele se izolează frecvent de la canceroşi, diabetici, indivizi subnutriţi, obezi etc. Candidele au fost izolate de la păsări şi mamifere (găini, curci, diferite rozătoare, miei, vaci, pisici, cîini, maimuţe etc.) din leziuni clinice evidente sau în afara oricărei stări patologice. Toate aceste date stabilesc caracterul larg saprofit al levurilor din genul *Candida*, care numai în anumite condiţii devin patogene pentru om şi animale.

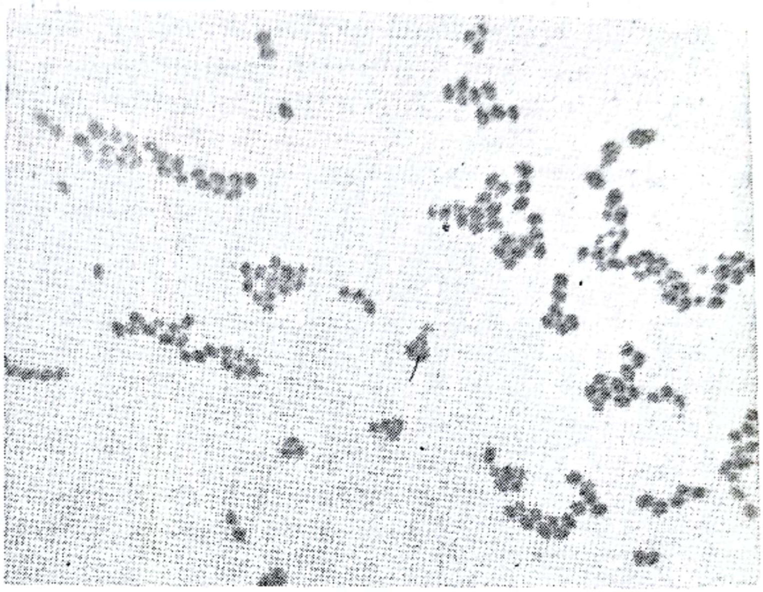


Fig. 163. — Frotiu din cultură de *Candida* (examen microscopic).

Caractere morfologice. Examinarea microscopică a frotiurilor pregătite *din leziuni candidomicotice* superficiale sau profunde arată *celule* variate ca formă, în general sferice, ovoide, cu muguri multipolari numite blastospori, cu diametrul de 2—15 microni, în medie 2—4 microni şi *pseudomicelii* simple sau ramificate, care sînt alcătuite din celule alungite, aşezate cap la cap, de dimensiuni cuprinse între 3 şi 5 microni lăţime şi 5—6 microni lungime. Dacă leziunea candidomicotică cercetată a fost determinată de *C. albicans* se observă formaţiunile caracteristice — *clamidosporii*: celule regulat sferice, cu diametrul între 7 şi 15 microni, intens colorabile cu coloranţii acizi, aşezate terminal în raport cu filamentele, uneori izolate, dar mai frecvent grupate; au peretele celular gros, cu dublu contur, refringent şi greu colorabil. Punerea în evidenţă a clamidosporilor constituie un element patognomonic deosebit de important pentru diagnostic. *Candida triadis*, *C. stellatoidea* şi *C. truncata* formează de asemenea clamidospori.

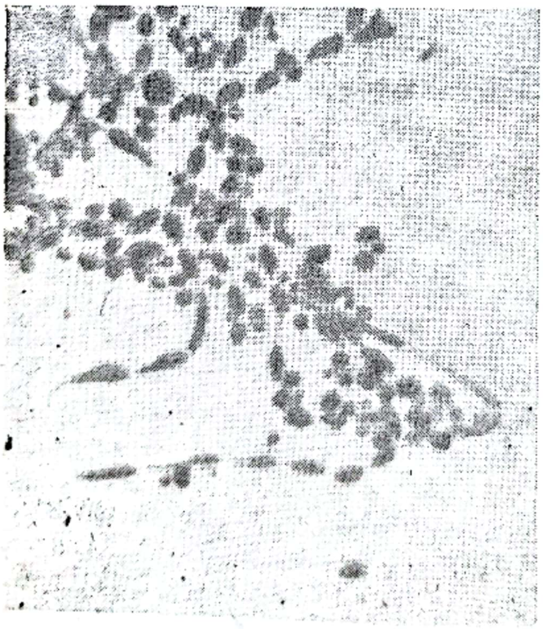


Fig. 164. — Frotiu din cultură veche de *Candida* cu filamente şi clamidospori.

Examinarea microscopică a frotiurilor pregătite *din culturi de candide* de 48—72 ore, colorate în acelaşi mod, arată celulele înmugurite caracteristice. Se observă că citoplasma celulelor conţine vacuole şi numeroase incluzii de natură lipidică, glucidică; se observă în mod clar incluzii metacromatice de natură volutinică.

În preparatele microscopice obținute din culturi pe medii speciale sau din culturi mai vechi, se observă în plus pseudomiceliile caracteristice și clamidosporii. Uneori se pot întîlni în cîmpul microscopic forme intermediare între elementele pseudomiceliale și clamidospori descrise sub numele de *protoclamidospori*.

Caractere de cultură: candidele cresc cu ușurință pe mediile solide și lichide obișnuite, în condiții de aerobioză și anaerobioză, la temperaturi cuprinse între + 18° și + 40° cu un optimum între + 30° și + 37° și în limite largi de pH 2,2—9,6. În mod obișnuit pe mediile solide se însămînțează în 3—4 puncte și cu o strie la partea superioară a coloanei de mediu înclinat. Observarea caracterelor de cultură se face la 24—48 de ore și se repetă la 10 și 20 de zile.

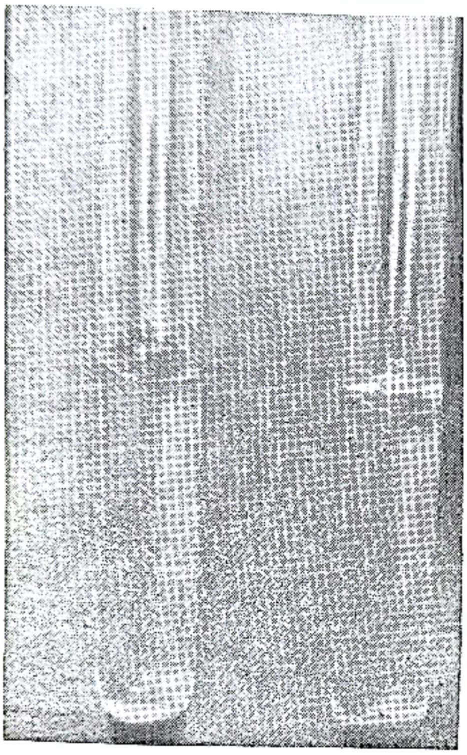


Fig. 165. — Stînga: culturi de *Candida albicans* (în mediu lichid), cu inel fin și depozit abundent; dreapta — cultură de C. *krusei* în mediu lichid, cu văl și depozit.

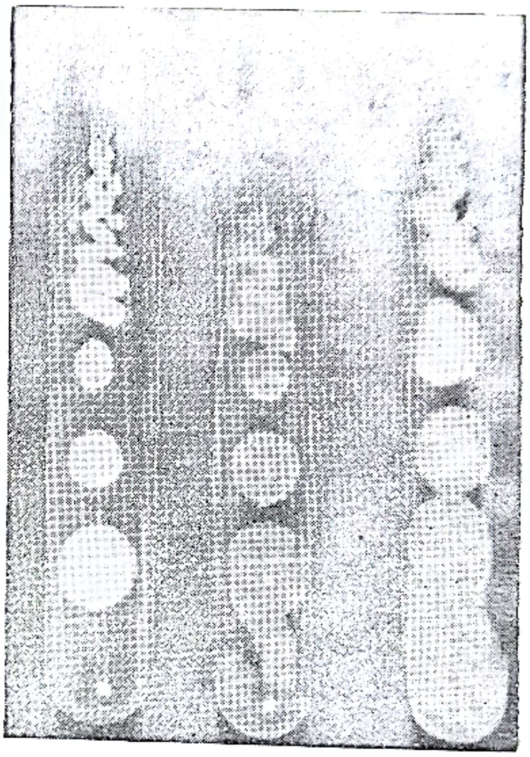


Fig. 166. — Colonii de C. *albicans* pe mediul Sabourraud.

a) Pe medii lichide (de exemplu apă peptonată 1% și glucozată 2%) se observă un depozit variabil ca mărime la aproape toate speciile; *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. intermedia* etc. formează văl la suprafața mediului; *C. macedoniensis*, *C. lipolytica* etc. formează inel. Caracterele de cultură pe medii lichide au o importanță secundară și numai uneori pot să dea o indicație pentru diferențierea *Candidelor*.

b) Pe medii solide (de exemplu Sabouraud) se observă la *C. albicans* colonii de formă „S", mari-albe-gălbui, cu centrul mai închis, cremoase, moi, groase, cu suprafață mată, cu marginile neregulate și cu adevărate franjuri de pseudomicelii ce pătrund în profunzimea mediului. La *C. lipolytica*, coloniile sînt membranoase cu pliuri fine pe suprafață și marginile neregulate din cauza pseudomiceliilor care se întind în mediu. La *C. tropicalis*, coloniile sînt gălbui, groase, opace, cu o zonă centrală, membranoasă și plisată și cu o zonă periferică mai mult netedă.

Coloniile groase albe, cremoase orientează totdeauna în direcția candidelor, dar ca și în cazul caracterelor observate pe medii lichide, nu se poate realiza prea mult în diferențierea speciilor după aspectul coloniilor.

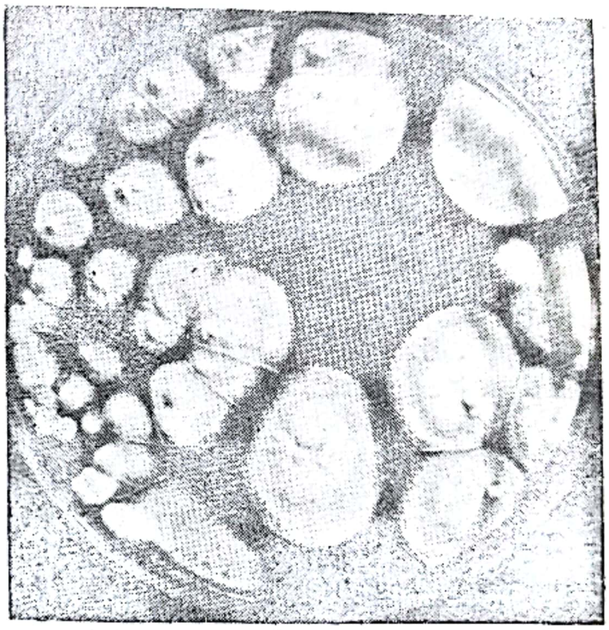


Fig. 167. — Colonii de *Geotrichum candidum* pe mediul Sabourraud.

Caracterele biochimice și de metabolism. În comparație cu aspectele de cultură variabile și necaracteristice, proprietățile biochimice ale candidelor se remarcă prin stabilitatea și specificitatea lor, ceea ce fixează rolul hotărîtor pe care îl dețin în determinarea speciilor acestui gen (Notă : Este necesar să se lucreze numai cu tulpini pure și substanțe chimice p.a. Uneori este necesară verificarea existenței unui eventual amestec de levuri).

a) *Fermentarea zaharurilor* (zimograma) se realizează prin diferite tehnici. Tehnica Langeron-Guerra, fără prealabilă desaerare, se practică în tuburi de aglutinare în care se introduc : apă peptonată 1% ; zahărul testat în concentrație de 2% și o ansă din cultura de levură studiată. Ca indicator se folosește tinctura de turnesol, indicatorul Andrade etc. Adăugarea parafinei sterile topite asigură punerea în evidență chiar a unor cantități minime de gaz. Trebuie să se folosească pentru fiecare tulpină cel puțin următoarele 6 zaharuri : glucoză, galactoză, lactoză, maltoză, rafinoză și zaharoză. Citirea formării de gaz și a formării de acid se face la 2 zile și la 20 de zile. Tulpinile care nu fermentează glucoza nu fermentează nici un alt zahar (Kluyver) și sînt numite azimatice.

b) *Asimilarea zaharurilor* (auxonograma pentru sursele de carbon) se practică pe mediul indicat de Lodder cu modificările ulterioare :

Geloză spălată	20 g
$(NH_4)_2SO_4$	2 g
KH_2PO_4	1,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25 g
Apă bidistilată Sterilizare la +100°, 2 ore.	1 000 ml

Mediul se însămînțează prin incorporare în momentul repartizării în plăci Petri sterile, care au fost anterior riguros spălate. Se elimină apa de condensare, eventual așezînd pe capacul cutiilor Petri o hîrtie de filtru sterilă glicerinată. Pe suprafaţa mediului într-o ordine determinată se depun mici cantităţi din zaharurile testate. După 2—3 zile se observă creşterea levurilor, pe o zonă corespunzătoare difuziunii zahărului asimilat. Aceleaşi rezultate se pot obţine cu o tehnică simplificată, care foloseşte discuri de hîrtie de filtru sterile, impregnate în soluţii de zaharuri 10%, uscate şi conservate în condiţii corespunzătoare de sterilitate şi uscăciune. Auxonograma pentru sursele de carbon se practică cel puţin cu următoarele zaharuri : glucoză, galactoză, lactoză, maltoză, rafinoză şi zaharoză.

c) *Asimilarea compuşilor azotaţi* (auxonograma pentru sursele de azot) se practică pe mediul indicat de Lodder, descris la auxonograma pentru sursele de carbon din care se înlocuieşte sulfatul de amoniu cu 20 g glucoză purissimă. Se vor urma aceleaşi indicaţii de folosire. Auxonograma pentru sursele de azot se practică cel puţin cu următoarele substanţe : sulfat de amoniu, nitrat de K, uree, asparagină, histidină, glicocol triptofan etc.

d) *Cultivarea în mediul cu alcool etilic 3%*. Mediul este format din alcool etilic 3%, sulfat de amoniu 0,1%, fosfat monopotasic 0,1% şi sulfat de magneziu cu 7 H_2O 0,01% în apă de robinet. Se însămînţează cu ansa şi se păstrează la + 37° timp de 7 zile, după care se notează absenţa sau prezenţa creşterii şi în acest ultim caz caracterele de cultură observate : inel, văl, depozit.

e) *Cultivarea pe mediul gelozat cu arbutină 0,5%* permite evidenţierea levurilor care desfac glucozidul arbutina, în glucoză şi agliconhidrochinonă. În jurul coloniilor ce scindează arbutina apar pete brun-negre caracteristice, după cîteva zile de menţinere a mediilor însămînţate la + 26°. Mediul constă din geloză simplă 2% cu 0,5% arbutină la care se adaugă în momentul turnării în plăci Petri 1—2 picături de clorură ferică 1% pentru 15 ml de mediu. Cercetarea caracterelor morfologice, de cultură şi biochimice ale unei tulpini de *Candida*, furnizează într-o perioadă de 2—20 de zile un ansamblu de elemente care folosite raţional, cu ajutorul diferitelor chei publicate permit stabilirea identităţii speciei izolate.

Tabelul XCIII înfăţişează principalele specii din genul *Candida* cu caracterele culturale şi fiziologice ce le diferenţiază unele de altele.

Boala la om. Candidele, în primul rînd *Candida albicans*, produc la om candidomicoze, infecţii localizate şi generalizate, caracterizate prin leziuni variabile ca întindere, gravitate şi aspect histopatologic, ale pielii, mucoaselor şi viscerelor. Principalele forme clinice întîlnite pot fi grupate astfel :

I. Candidomicoze bucale şi peribucale (glosită levurică, stomatită eritematoasă, stomatită pseudomembranoasă, amigdalită levurică, infecţie candidomicotică generalizată a mucoaselor cavităţii bucale, candidomicozele peribucale etc.).

II. Candidomicozele pielii şi ale fanerelor.

III. Candidomicoze genitale (vaginite, vulvite, balanopostite etc.).

IV. Candidomicoze viscerale (bronhopatii, pneumopatii, meningite, endocardite, infecţii digestive, infecţii urinare etc.).

V. Septicemii cu *Candida*.

Se observă de asemenea variate manifestări alergice candidozice.

Tabelul XCIII

Caracterele de cultură şi biochimice ale diferitelor specii de *Candida*

Specia	Clamidospori	Caractere de cultură					Caractere fiziologice														
		Caractere de cultură			Colonii pe m. Sabouraud	Colonii pe geloză-sînge	Zimograma						Auxonomograma						NO$_3$K	Alcool 3%	Arbutină
		Văl	Inel	Depozit			G	Gl	L	M	R	Z	G	L	M	R	Z				
C. albicans	+	–	–	+	Colonii cremoase	Albe-cenuşii	AG	AG	–	AG	–	–	+	–	+	–	+	–	–	–
C. tropicalis	–	+	+	+	Aspect variabil	Franjuri pseudomicelii în jurul coloniilor	AG	–	–	AG	–	AG	+	–	+	–	+	–	±	±
C. pseudotropicalis	–	–	±	+	Colonii cremoase	Colonii mici	AG	–	AG	–	AG	AG	+	+	–	+	+	–	+	+
C. krusei	–	+	±	–	Colonii uscate	Albe-cenuşii mici	AG	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	+	–
C. guillermondi	–	±	+	+	Colonii cremoase uneori plisate		AG	–	–	–	AG	AG	+	–	±	+	+	–	+	+
C. parakrusei (*parapsilosis*)	–	±	+	+	Colonii cremoase	Albe-perlate rotunde plate	AG	–	–	–	–	–	+	–	+	–	+	–	–	–
C. intermedia	–	+	+	+	Colonii cremoase cu margini neregulate		AG	AG	–	AG	AG	AG	+	+	+	+	+	–	–	+
C. stellatoidea	+	–	+	+	Colonii cremoase	Aspect stelat cu centrul ridicat cu prelungiri radiare	AG	–	–	AG	–	–	+	–	+	–	–	–	+	–
C. curvata	–	+	–	+	Colonii gălbui uşor plisate		–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+	–	+	±
C. zeylanoides	–	±	+	+	Colonii albe-cenuşii		–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	±	–

Caracterul ubicuitar al candidelor, marele număr de specii şi tulpini saprofite care se pot izola cu relativă uşurinţă din organismul indivizilor sănătoşi şi varietatea manifestărilor clinice candidomicotice, îngreunează încă cunoaşterea exactă a condiţiilor intime în care candidele saprofite devin patogene pentru om şi animale. În bogata literatură existentă sînt citate numeroase fapte care scot în relief acele modificări ale macroorganismului ce intervin în producerea candidomicozelor.

a) Un prim grup de fapte se referă la repetate observaţii clinice care au stabilit instalarea candidomicozelor la bolnavii cu profunde *tulburări metabolice* (diabet, gută, cancer, ciroze hepatice, obezitate, caşexie, distrofie, precum şi în stări de hipo- sau avitaminoze). În toate aceste stări patologice infecţia candidomicotică este un epifenomen, o manifestare a unor alteraţii organice profunde.

b) Alte observaţii clinice scot în evidenţă raportul direct dintre scăderea rezistenţei naturale şi apariţia candidomicozelor, ceea ce este mai pregnant la nou-născuţi, la bătrîni, la femei gravide etc.

c) O serie de *traumatisme repetate* ale pielii şi mucoaselor, uneori cu caracter profesional, favorizează apariţia leziunilor specifice candidomicotice.

d) Un ultim grup de fapte, mai numeros şi de dată relativ recentă, cuprinde acele observaţii clinice şi date experimentale, în care se stabileşte o legătură cauzală între administrarea unor medicamente (antibiotice, citostatice, hormoni etc.) şi apariţia infecţiilor candidomicotice la indivizii respectivi. Toţi cei care s-au ocupat cu această problemă recunosc creşterea numărului persoanelor de la care se pot izola candide, în afara oricărei leziuni. Se constată, în general, sporirea reală a frecvenţei candidomicozelor cutanate, mucoase, viscerale şi generalizate. Acordul încetează de a fi unanim în ceea ce priveşte mecanismul prin care se realizează această adevărată „îmbolnăvire medicamentoasă''. Cele mai multe date se referă la legătura dintre administrarea antibioticelor şi apariţia candidomicozelor.

1. O serie de experienţe efectuate *in vitro*, în parte infirmate, pledează pentru *acţiunea stimulantă a antibioticelor* (tetraciclinelor) asupra candidelor. Asemenea rezultate nu se pot transpune ca atare *in vivo*. Este puţin probabil acest mecanism în apariţia candidomicozelor.

2. Numeroase experienţe şi observaţii clinice evidenţiază însemnătatea *perturbării florei microbiene normale* a organismului uman de către antibioticele cu spectru larg de acţiune, care înlătură acele microorganisme care sînt antagoniste normale ale candidelor, permiţînd prin aceasta înmulţirea excesivă a acestora şi realizarea acelei porţi de intrare în macroorganism, inexistentă pentru candidele saprofite. Este recunoscut caracterul complex şi importanţa fiziologică a florei microbiene normale a organismelor uman şi animal. Candidele sînt componenţi obişnuiţi ai microflorei normale umane. Alţi componenţi ca de exemplu *Lactobacillus acidophilus*, *B. subtilis* etc., inhibă dezvoltarea candidelor. Antibioticele cu spectru larg de acţiune realizează în organismul uman, concentraţii care împiedică nu numai dezvoltarea microbilor patogeni, dar stînjenesc considerabil activitatea florei microbiene normale.

Înlăturarea unor microbi antagonişti ca *L. acidophilus*, realizează „desinhibarea biologică'' (Planieles) condiţie indispensabilă multiplicării excesive a candidelor în organismul bolnavului tratat cu antibiotice.

Modificările toxice, alergice etc., locale şi generale determinate de antibiotice contribuie de asemenea la apariţia candidomicozelor.

3. Unii cercetători, pornind de la date experimentale care evidenţiază rolul *avitaminozelor B*, în producerea mai rapidă a infecţiei candidomicotice, interpretează influenţa antibioticelor asupra florei normale în sensul dispariţiei din flora microbiană a organismului normal a speciilor producătoare de vitamine din grupul B şi a persistenţei speciilor consumatoare de vitamine din grupul B. Această interpretare nu concordă cu datele comune care arată că avitaminoza B se instalează relativ greu, în vreme ce infecţia candidomicotică evoluează rapid.

Menţionăm că o serie de presupuneri anterioare cu privire la rolul unor factori locali (aciditatea bucală, alimentaţia copiilor etc.) sînt depăşite.

Probabil că antibioticele acţionează în sinergism, cu o serie de alţi factori locali şi generali, încă, greu de diferenţiat. În legătură cu faptul că, uneori, se pot decela candide în urină, în afara unei infecţii clinice aparente, s-a emis presupunerea că antibioticele ar pune în evidenţă un proces candidomicotic preexistent.

Infecţia experimentală. Nu există un animal de elecţie care să reproducă leziunile umane. Păsările sau mamiferele care în mod natural fac infecţii candidomicotice nu realizează un model experimental util deoarece o serie de elemente ce ţin de microorganismul levurian nu sînt încă elucidate.

Iepurele, inoculat intravenos cu aproximativ 400 000 de celule, moare în 3—6 zile cu leziuni macroscopice (microabcese) şi microscopice în rinichi, plămîn, ficat, creier etc.

Şoarecele alb, inoculat intravenos cu tulpini virulente face o infecţie mortală. Între 5 şi 15 zile, animalul moare cu leziuni caracteristice în rinichi, care apar măriţi de volum cu noduli mici albi, de mărimea unui bob de mei în corticală.

Cobaiul, inoculat intracardiac, face o infecţie mortală, care evoluează în 5—14 zile, cu leziuni macroscopice şi microscopice caracteristice în rinichi, ficat, creier etc. Determinarea tulpinilor patogene se poate face pe şoarece folosind calea intravenoasă. Sînt patogene cele mai multe tulpini din specia *Candida albicans*, precum şi unele tulpini din specia *Candida tropicalis*.

Imunitatea în candidomicoze este încă incomplet studiată, ceea ce se explică printr-o serie de particularităţi ale candidelor (volumul celulelor, structura biochimică complexă, natura polizaharidică a membranei celulare etc.). Reacţiile de apărare sînt diferite ca intensitate şi formă, de acelea întîlnite în infecţiile bacteriene şi inframicrobiene. Forma clinică, intensitatea procesului candidomicotic şi durata sa determină în cea mai mare măsură răspunsul macroorganismului uman. În leziunile superficiale, limitate, de durată scurtă, reacţiile de imunitate sînt frecvent negative, în vreme ce în candidomicozele viscerale, evidenţierea acestora este posibilă, în aproape toate cazurile.

Existenţa unor antigene comune candidelor, sacharomicetelor şi altor grupuri de levuri au fost stabilite prin reacţiile de aglutinare şi precipitare. În serul indivizilor bolnavi şi al animalelor imunizate, se pun în evidenţă aglutinine, folosindu-se ca antigen o suspensie a unei culturi de *Candida* *albicans* de 24 de ore pe mediul solid Sabouraud. Existenţa aglutininelor anti-*C. albicans* la indivizi sănătoşi, procentul crescut al titrurilor mici, diminuează valoarea reacţiei şi fixează titruri semnificative numai pe cele superioare diluţiei de ser 1 : 160 (Kaşkin). Rezultatele superioare ca specificitate şi sensibilitate se obţin prin cercetarea anticorpilor fixatori de complement. În R.F.C. se folosesc ca antigen, celule levuriene, criolizate, extracte alcoolate, fenolate etc., din culturi de *Candida*. Reacţia este pozitivă la peste 90% din bolnavi şi în linii generale concordă cu evoluţia clinică a procesului candidomicotic. R.F.C. este pozitivă şi la un număr apreciabil de persoane sănătoase. Cercetările privind evidenţierea altor anticorpi nu sînt concludente. Nu există imunitate dobîndită natural faţă de o nouă îmbolnăvire candidomicotică. În cercetări experimentale, animalele imunizate au făcut o infecţie mai prelungită, iar în practică se obţin uneori rezultate bune prin vaccinoterapie.

Reacţiile alergice (intradermoreacţia la levurină şi alte alergene) sînt pozitive în candidomicoze şi dovedesc restructurarea imunobiologică a macroorganismului uman. Uneori, indivizi sănătoşi prezintă reacţii alergice pozitive, în vreme ce la unii bolnavi nu se poate pune în evidenţă starea de sensibilizare specifică.

Diagnosticul de laborator

1. **Recoltarea produselor patologice,** care trebuie cercetate în laborator, variază, ca tehnică, după forma clinică al cărei diagnostic trebuie stabilit. Totdeauna trebuie avută în vedere posibilitatea existenţei candidelor în cavităţile naturale ale organismului, în conţinutul intestinal, în spută, în pliurile cutanate etc. ca saprofite, în afara oricăror leziuni candidomicotice. Pe cît va fi cu putinţă de realizat, recoltarea se va face din leziunea caracteristică şi se va evita contaminarea ulterioară a materialului prelevat cu exsudate sau secreţii care ar putea să conţină candide saprofite.

2. **Examenul microscopic direct** al materialului recoltat în preparat proaspăt între lamă şi lamelă, colorat sau nu cu lugol, nigrozină etc., trebuie părăsit, datorită indicaţiilor minore pe care le furnizează.

3. **Examenul microscopic al unui frotiu** din produsul patologic, colorat cu o soluţie 1% de albastru de metilen, oferă posibilitatea observării celulelor levuriene cu mugurii caracteristici, pseudofilamentelor şi uneori a clamidosporilor caracteristici pentru *C. albicans*. Simpla constatare a celulelor înmugurite, chiar dacă sînt în număr mare, are o valoare redusă, în cazul cînd produsul patologic examinat provine din cavitatea bucală, cavitatea vaginală etc. O semnificaţie diagnostică deosebită se realizează în cazul examinării unui produs recoltat dintr-o leziune închisă, în condiţii de necontaminare ulterioară.

4. **Insămînţarea produsului recoltat în vederea obţinerii candidelor în cultură pură.** Din toate mediile de cultură pe care se pot dezvolta candidele, mediul Sabouraud solid este cel mai potrivit.

Mediul Sabouraud se pregăteşte astfel: apă distilată 1 000 ml, peptonă 10 g, glucoză brută 20 g, geloză 20 g. Se ţin la autoclav cu capacul deschis pînă la realizarea unui amestec omogen. Se agită. Se repartizează după necesităţi şi se sterilizează timp de 20 de minute la + 115°.

Adăugarea de antibiotice asigură selectivitatea acestui mediu şi scurtează la minimum timpul lung necesar altădată pentru obţinerea candidelor în cultură pură (se adaugă penicilină şi streptomicină 200 u./ml de mediu, sau cloramfenicol 500 γ/ml de mediu, sau actidionă în concentraţie 0,5%. Se recomandă în mod special aureociclină 50—100 γ/ml de mediu). Mediile însămînţate se ţin la termostat la + 37° şi se examinează la 24, 48 şi 72 de ore. Coloniile albe, cremoase, se trec pe mediul Sabouraud cu antibiotice, se controlează microscopic pentru prezenţa candidelor şi pentru puritatea culturii.

În septicemiile candidomicotice, în endocarditele de aceeaşi natură se practică hemocultura. Se recomandă recoltarea sîngelui prin puncţie arterială pe mediul Sabouraud lichid, respectîndu-se proporţia mediu-sînge 1 : 50. Se menţine 6—7 zile la 37°, efectuîndu-se sistematic treceri pe mediul Sabouraud solid cu sau fără antibiotice.

Urocultura se va practica pe mediul Sabouraud lichid, numai cu urină proaspătă, recoltată prin sondaj vezical perfect aseptic. Se va însămînţa în 25—50 ml mediu 1—2 ml urină tulbure sau sedimentul rezultat după centrifugare la 3 000 t/min. timp de 15 minute, a urinii limpezi recoltate. Deoarece în condiţii normale candidele nu se găsesc în urină, rezultatul pozitiv al unei uroculturi are o semnificaţie precisă pentru diagnosticul infecţiei candidomicotice a aparatului urinar.

5. **Identificarea culturii pure izolate.** Pentru obţinerea a acelui complex de date morfologice de cultură şi biochimice necesare identificării candidelor, cultura obţinută prin a doua trecere pe Sabouraud cu antibiotice, se controlează microscopic pentru puritate şi apoi se însămînţează pe următoarele medii :

a) Mediul Sabouraud solid fără antibiotice.

b) Mediul Sabouraud lichid.

c) Mediul solid orez-bilă pentru a obţine preparatele microscopice necesare cercetării morfologiei levurii izolate (ascospori, pseudofilamente, clamidospori etc.).

Candidele sînt levuri anascosporate. Pentru a verifica absenţa ascelor se efectuează frotiuri subţiri din cultura pe mediul orez-bilă, care se fixează la flacără şi se colorează după tehnica Gray :

Soluţia A. Verde malachit 0,50 g ; fucsină bazică 0,05 g ; apă distilată 100 ml.

Soluţia B. Soluţie apoasă de clorură de sodiu 8 ‰ În momentul folosirii se face un amestec de 2 părţi soluţie A şi 8 părţi soluţie B. Se acoperă lamele fixate cu acest amestec timp de 10 minute. Se spală cu apă şi se colorează cu higrozină 5% timp de 1—2 minute. Se spală cu apă blastosporii, se colorează în violet, iar ascosporii din asce în verde albastru.

Dacă prin celelalte determinări se strîng date din care rezultă că s-a izolat o levură ascosporată, se repetă cercetarea ascelor. În acest sens, cultura este trecută pe mediul cu must de malţ gelozat 2% iar apoi pe mediul Garodkova. De pe acest mediu se fac frotiuri, care se colorează după tehnica Gray.

Deşi sînt citate numeroase metode de colorare a clamidosporilor, totuşi cea mai recomandată este simpla colorare cu o soluţie 1% de albastru de metilen.

Mediul solid orez-bilă se prepară în felul următor : se fierb 20 g orez în 700 ml apă distilată, timp de 45 de minute. Se filtrează prin tifon. Filtratul cu 20 g geloză fibre adus la 1 000 ml cu apă distilată se sterilizează 15 minute la + 115°. Se adaugă aseptic bilă de bou proaspătă sterilă în proporţie de 20%. Se repartizează steril în tuburi, care se înclină. Se indică următoarea tehnică pentru punerea în evidenţă a clamidosporilor : mediul orez-bilă se repartizează în strat subţire în plăci Petri. Se însămînţează cu ansa cultura de *Candida*. Se acoperă cu lamele sterile zonele însămînţate. Se incubează la + 26°. Se examinează la microscop cu obiectiv 3 şi condensatorul coborît, la 24 şi 48 de ore.

Din cultura pură obţinută pe mediul Sabouraud se practică zimograma al cărei rezultat se poate obţine în marea majoritate a cazurilor la 48 de ore.

Variatele metode, descrise pentru studiul candidelor, sînt deficitare din punctul de vedere al laboratorului clinic, deoarece necesită un timp lung (20—30 de zile) pînă la obţinerea tuturor datelor morfologice, de cultură, biochimice necesare identificării levurii studiate. Metodica expusă pînă aici simplifică şi scurtează din timpul necesar după tehnicile clasice făcînd posibil ca practic să se renunţe la alte tehnici complimentare, cînd prin metode folosite pînă la un moment dat s-au obţinut datele esenţiale identificării tulpinii izolate.

Pentru toate tulpinile la care nu s-au obţinut date concludente, se trece la efectuarea auxonogramei pentru surse de carbon şi azot, la practicarea culturilor în mediul cu alcool 3% şi pe mediul cu arbutină 0,5% etc.

Trebuie avut în vedere că, în condiţiile unei tehnici riguroase, o importantă sursă de rezultate neconcordante cu datele conţinute în diferitele chei de identificare, o constituie asocierile de levuri. În asemenea situaţii se va proceda la dispersii pe mediul Sabouraud solid, studiindu-se noile tulpini izolate şi consemnîndu-se în rezultatul final speciile componente ale amestecului.

Constatarea microscopică a candidelor, izolarea lor din produsele patologice însămînţate şi stabilirea identităţii speciei patogene *C. albicans* sau a speciilor mai frecvent patogene, nu sînt suficiente în toate cazurile pentru a putea confirma în mod neîndoielnic natura candidomicotică a unui proces patologic.

După Kaşkin, în condiţiile ubicuităţii candidelor şi complexităţii mecanismelor de apariţie a candidomicozelor, un diagnostic de laborator complect ar trebui să stabilească indici reali cu privire la etiologia candidomicotică a infecţiei cercetate, ceea ce ar necesita următoarele examene complementare :

a) repetarea prelevărilor şi însămînţărilor de 3—4 ori şi aprecierea cantitativă a candidelor izolate ;

b) determinarea patogenităţii tulpinilor izolate pe şoarece şi pe iepure ;

c) practicarea reacţiei de aglutinare şi a reacţiei de fixare a complementului ;

d) practicarea reacţiilor alergice şi urmărirea dinamicii lor.

În cazul diagnosticării candidomicozelor generalizate cu sfîrşit fatal, este necesar ca diagnosticul microbiologic să fie completat cu cercetarea anatomopatologică a modificărilor tisulare din rinichi, ficat, plămîn, creier etc. şi mai ales evidenţierea candidelor în ţesuturi prin coloraţii speciale, ca de exemplu : Hotckis-McManus ale secţiunilor executate din piesele incluse la parafină.

La toate acestea se adaugă necesitatea coroborării tuturor datelor de laborator cu datele clinice. Este de presupus că, dacă această metodică exigentă ar fi urmată în toate infecţiile presupuse a fi de natură candidomicotică, pe de o parte numărul publicaţiilor privind acest subiect ar scădea, iar pe de altă parte s-ar obţine date mai concludente cu privire la elementele cu care participă candidele în procesul infecţios.

Tratamentul specific. În terapia infecţiilor candidomicotice au fost propuse şi folosite numeroase substanţe : bicarbonat de Na, borat şi perborat de Na, violet de genţiana, albastru de metilen, verde malachit, iodură de K, mercurocrom, permanganat de K etc. Slaba lor eficacitate a determinat utilizarea unor produşi de sinteză ca : acidul undecilenic, derivaţi de oxichinoleină, derivaţi crezolici, derivaţii acidului ditiocarbamic, antihistaminice etc. Acţiunea acestor substanţe este locală, iar din cauza toxicităţii lor şi a accidentelor pe care le determină, nu se pot realiza în organism concentraţii utile necesare tratamentului localizărilor viscerale sau infecţiilor generale. Un loc aparte ocupă esterii acidului parahidroxibenzoic, care pot fi folosiţi cu bune rezultate în tratamentul candidomicozelor superficiale şi profunde.

Dintre antibioticele cu acţiune antimicotică prezintă acţiune anticandida, antibioticele tetraene (candicidina, candidina, trichomicina etc.), antibioticele heptaene (nistatina, rimocidina etc.) şi altele. În practica medicală a intrat nistatina (Stamicin), care se obţine din *Streptomyces noursei*. În experienţele efectuate *in vitro*, *C. albicans* s-a dovedit sensibilă la concentraţii de $3\gamma-25\gamma$/ml de mediu. S-au semnalat tulpini de *C. albicans* rezistente, iar prin adaptări *in vitro* s-a putut mări de cîteva ori concentraţia minimă activă de nistatin faţă de tulpinile adaptate. Se folosesc şi vaccinuri corpusculare pentru vaccinoterapie în unele forme cronice.

Bibliografie

Adams M. — Bacteriophages, Interscience Publishers Inc. New-York — Ltd London, 1959.

Ado A. D. — Materiali k patologhiceskoi fisiologhii allerghiceskih reakţii Kazan, 1947.

Ado A. D. — Antigen kak cerezviceainic razdrajiteli nervnoi sistemi, Izdatelstvo Akadem mediținskih Nauk SSSR, Moskva 1952.

* * * American Public Health Assoc. Commitee Diagnostic procedures for Virus and Rickettsia diseases, Th. Francis jr. (ed), New York, 1956.

Aristovski V. M., Minkevici, I. E., Frid S. T. — Ucebnik Mediținskoi Mikrobiologhii, Medghiz, Leningrad, 1949.

Austoni M. — Le Leptospirosi, ed. a II-a, Tipografia del Seminario, Padova, 1953.

* * * Bacterial anatomy, Sixth Symposium of the Society for general Microbiology, University Press, Cambridge, 1956.

Baldovin-Agapi C. — Scarlatina, Editura medicală, Bucureşti, 1958.

Berger W., Hansen K. — Allergie, Ed. G. Thieme, Leipzig, 1940.

Besson A. — Précis de technique microbiologique, Librairie J. — B. Baillière et fils, Paris, 1928.

Blake H., Rake G. — Viral and Rickettsial Disease of the Skin Eye and Mucous Membranes of Man, Ed. J. A. Churchil, Ltd. London, 1955.

Boér L. — Curs de epidemiologie specială, Ed. I.M.F. Tg. Mureş, 1954.

Bordet J. — Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses, Ed. Masson, Paris, 1939.

Boyd W. — Fundamentals of Immunology, Interscience Publishers Inc., New York, London, 1956.

Breed R., Murray E. G. D., Smith N. — Bergey's Manual of determinative bacteriology, ed. a 7-a, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1957.

Brumpt E. — Précis de Parasitologie, Masson et Cie, Paris, 1949.

Burnet R. M., Fenner F. — The Production of Antibodies, Ed. Macmillan, Melbourne, 1949.

Callmette A. — L'infection bacillaire et la tuberculose, Ed. Masson et Cie, Paris, 1936.

Cherry B. W., şi colab., — Fluorescent antibody techiques in the diagnosis of communicable diseases. U. S. Depatment of Health, Education and Welfare Atlanta, Georgia 1960.

Ciucă M., Nestorescu N., Popovici M. şi colab. — Elemente de bacteriologie aplicată, Ed. I.P.S.M.F., Bucureşti,.1957.

Clifton C. E. — Introduction to Bacterial Physiology, Mc Graw-Hill Book Co., New York, 1957.

Combiescu D., Sturdza N. şi colab. — Leptospirozele. Studii şi cercetări făcute în R.P.R. Raport la Congresul naţional de ştiinţe medicale, Ed. Acad. R.P.R., Bucureşti, 1957.

Conant N. F. şi colab. — Manual of Clinical Micology, Saunders Company, Philadelphia 1958.

Cooke R. A. şi colab. — Allergy in Theory and practice, Ed. Saunders, Philadelphia, 1947.

Coudert J. — Guide pratique de mycologie médicale, Masson et Cie, Paris, 1955.

Kovalevski C. D. — Îngrijirea animalelor mici de laborator, trad. Editura de stat pentru literatura ştiinţifică şi didactică, Bucureşti, 1952.

Cushing J., Campbell D. — Principles of Immunology, Mc Graw-Hill Book Company, Inc-New York, Toronto, London, 1957.

Doerr R. — Die Immunitätsforschung, Ed. Springen-Verlag, Viena, 1949.

Dubos R. J. — The Bacterial Cell in its Relation to Problems of Virulence, Immunity and Chemoherapy, Harvard University Press, Cambridge, 1945.

Dubos R. J. — The Bacterial Cell, Harvard University Press, Cambridge, Massachussetts, 1946.

Dubos R. J. — Bacterial and Mycotic Infections of Man, ed. a 2-a J. B. Lippincott Company Philadelphia, Montreal, 1952.

Dumas J. — Bactériologie médicale, Ed. Médicales Flammarion, Paris, 1953.

Dumas J. — Les animaux de laboratoire, Ed. Médicales Flammarion Paris, 1953.

Edsall G. — The nature and significance of the antibody response, Pappenheimer A. W., Ed. Columbia Univ. Press, New York, 1953.

Edward J. F. — The care and breeding of laboratory animals, John Wiley and Sons Inc. New York 1950; Chapman and Hall, Limited, London, 1950.

Evolceanu R. şi colab. — Dermatomicoze. Editura medicală, Bucureşti, 1956.

Fejer E. — Orvosi Mycologia, Akademiai Kiado, Budapest, 1957.

Frobisher M. JR. — Fundamentals of Bacteriology, ed. a 4-a, W. B. Saunders, Philadelphia and London, 1949.

Fry B. A. — The nitrogen metabolism of microorganisms, Ed. Mathew Wiley, London, New York, 1955.

Gale E. F. — The chemical activites of bacteria, Univ. Press, London, 1948.

Gamaleia N. F. — Sobranie Socinenii, vol. II, Osnovî Mediţinskoi Mikrobiologhii Izd. Akad. Med. Nauk, Moskva, 1951.

Gastinel P. — Précis de bactériologie médicale, ed. a 2-a, Masson et Cie, Paris, 1957.

Gheorghiu C. V. — Coloranţi organici, Revista ştiinţifică „V. Adamachi", Iaşi, 1947.

Gostev V. K. — Biohimiceskie osnovî Mediţinskoi bacteriologhii, Akad. Med. Nauk SSSR, Moskva 1951.

Gromaşevski V. L., Vaindrah M. G. — Manual de epidemiologie specială, trad. Editura de stat, Bucureşti, 1947.

Gsell O., Wiessmann E. — Leptospirosen, Hans Huber, Bern, 1952.

Hayes W. — The genetics of bacteria and their virruses Blackwell Sc. Publ. Oxford 1964.

Hauduroy P. — Microbiologie générale et technique microbiologique, Masson et Cie, Paris, 1947; Roth et Cie, Lausanne, 1947.

Heinrich H. — Grundriss der Bakteriologie und Serologie, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, D.D.R., 1959.

Institutul de ftiziologie — Morfopatologia tuberculozei (sub redacţia prof. M. Nasta), Ed. Acad. R.P.R., Bucureşti, 1957.

Institutul de ftiziologie — Tuberculoza (sub redacţia prof. M. Nasta, şi dr. A. Brill), Editura medicală Bucureşti, 1958.

Ivaşenţov A. G. şi colab. — Manual de boli infecţioase, trad. E.S., Bucureşti, 1953.

Jacob F., Woollman E. L. — Sexuality and the genetics of bacteria „Academic Press, N. York 1961.

Jordan E., Burrows W. — Textbook of Bacteriology, ed. a 14-a, W. B. Saunders Company Philadelphia, London 1946.

Kabat E. A., Mayer M. M. — Experimental Immunochemistry, Charles C. Thomas Ed. Springfield, Illinois, 1948.

Kaşkin P. N. — Dermatomikozî, Medghiz, Moskva, 1950.

Kaşkin P. N. — Mikrobiologhia, Medghiz, Moskva, 1958.

Kauffmann F. — Enterobacteriaceae, Ejnar Munksgaard Publishers, Copenhaga, 1954.

Kauffmann F. — Die Bakteriologie der Salmonella Species, Munksgaard, Copenhaga, 1961.

Kiktenko S. K. — Leptospirozî celoveka, Medghiz, Moskva, 1955.

Kravcenko A. T. — Problemî immuniteta, Medghiz, Moskva, 1941.

Kuzin A. M. — Himia i biochimia patogenîh Mikrobov, Mediţinskoe gos. izd. Moskva, 1948.

Lammana C., Mallette M. F. — Basis bacteriology and its biological and chemical background, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1953.

Langeron M. — Précis de Microscopie, Masson et Cie, Paris, 1949.

Langeron M., Vanbreuseghem R. — Précis de Mycologie, Masson et Cie, Paris, 1949.

Landsteiner K. — The specificity of serological reactions, Harvard Univ. Press, Cambridge, 1945.

Lebedeva N. M. — Manual practic de microbiologie, trad. Editura de stat, Bucureşti, 1948.

Marrack J. R. — The chemistry of antigens and antibodies, Med. Res. Counc. Sp. Reports, London 1938.

Mecinikov I. — Nevospriimcivost v infecţionnîh bolezniah, Medghiz, Moskva, 1947.

Mecinikov I. — Opere alese de biologie, trad. Ed. Acad. R.P.R., Bucureşti, 1953.

Mesrobeanu L., Păunescu E. — Fiziologie bacteriană, Ed. Acad. R.P.R., Bucureşti, 1960.

Metchnikoff E. — Leçons sur la pathologie comparée de l'inflamation, Masson et Cie, Paris, 1892.

Nestorescu N., Popovici M. — Toxiinfecţiile alimentare, Editura medicală, Bucureşti, 1959.

Névot A. — Le diagnostic bactériologique en pratique médicale, Masson et Cie, Paris, 1958.

Nicolau St., Homoriceanu D., Dimitriu R., Mincu A., Stoian V. — Aspecte epidemiologice în sifilisul florid, Editura medicală, Bucureşti, 1958.

Nicolau G., Dănilă P. — Serologia sifilisului, Editura medicală, Bucureşti, 1958.

Pacheco G., Thiago de Mello M. — Brucelose, Servico grafico do Instituto Brasiliero de geografia e estatistica, Rio de Janeiro, 1956.

Peşkov M. A. — Ţitologhia Bakterii, Izd. Akad. Nauk S.S.S.R., Moskva — Leningrad, 1955.

Pollitzer R. — La peste, Org. Mondiale de la Santé, Palais des Nations, Genève, 1954.

Pollitzer E. — Le choléra, Org. Mondiale de la Santé, Palais des Nations, Geneve 1960.

Pop A., Benedict I. — Bruceloza umană, Editura medicală, Bucureşti, 1954.

Porter J. R. — Bacterial Chemistry and Physiology, Ed. Willey and Chapman New York London, 1955.

Prévot A. R. — Biologie des maladies dues aux anaérobes, Ed. Méd. Flammarion, Paris, 1955.

Putnoky G., Boér L. — Bacteriologie specială, Ed. I.M.F., Tg. Mureş, 1956.

Kaffels S. — Immunity, Hypersensitivity, Serology, Appleton-Century-Crofts Inc., New York 1953.

Ratner B. — Allergy, Anaphylaxis and Immunotherapy, Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 1943.

Relyveld E. H. — La toxine et l'anatoxine diphtérique, Ed. Hermann, Paris, 1959.

Scanga Fr. — La celulla batterica, Il pensiero scientifico, Roma, 1954.

Sinai L. G., Birgher G. C. — Diagnosticul microbiologic al bolilor infecţioase, trad. Ed. de stat, Bucureşti, 1950.

Smith D., Conant N., Beard J. şi colab. — Zinsser's Textbook of Bacteriology, ed. a X-a Appleton-Century-Crofts, Inc., New York, 1952.

Stamatin N. — Microbiologie veterinară, Ed. agro-silvică de stat, Bucureşti, 1957.

Turner T. B., Hollander D. K. — Biologie des tréponématoses d'après les études effectuées à „International treponematosis laboratory center, John Hopkins University" sous les auspices de l'O.M.S., Série de Monographies nr. 35, O.M.S., Genève, 1959.

Thiel H. P. van — The leptospiroses, Leiden, 1948.

Timakov V. D. — Microbial variation, Pergamon Press, London, New York, Paris, Los Angeles, 1959.

Timakov V. D. — Izmencivost Mikroorganizmov i Bakteriofaghia Medghiz, Moskwa, 1960.

Timakov V. D. — Izmencivost Mikroorganizmov, Akademia Mediţinskih Nauk SSSR Moskva, 1957.

Timakov V. D. şi Goldfarb D. M. — Osnovî eksperimentalnoi, Mediţinskoi Bakteriologhi, Moskva, 1958, Gosudarstvenîi isdatelstvo Mediţinskoi literaturî, Medghiz.

Urbach E., Gottlieb P. M. — Allergy, Ed. Grune and Stratton, New York, 1946.

Van Heyningen W. R. — Bacterial Toxins, Blackwell scientific Publications, Osford, 1950.

Varfolomeeva A. A. — Leptospirozî celoveka, Medghiz, Moskva, 1948.

Voiculescu M. — Boli infecţioase, vol. II, Editura medicală, Bucureşti, 1960.

Weinberg M., Nativelle R., Prévot A. R. — Les microbes anaérobes, Ed. Masson et Cie, Paris, 1937.

Wildfuhr G. — Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Epidemiologie VEB G. Thieme, Leipzig, 1959.

Wilson G. S., Miles A. A. — Topley and Wilson's principles of Bacteriology and Immunity, ed. a 4-a, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1957.

Wolff J. W. — Zoonoses Colloque O.M.S. /FAO sur les Zoonoses, Viena, 1952, O.M.S., Genève 1954.

Worden A., Lane-Petter W. — The Ufaw Handbook on the care and management of laboratory animals, ed. a 2-a, Ufaw, London, 1957.

Zdrodovski P. F., Golinevici E. M. — Ucenik o rikettsiah i rikettsiozah, Medghiz, Moskwa 1953.

Zdrodovski P. F. — Problema reaktivnosti v ucenii of infekţii i imunitete, Medghiz, Moskwa, 1950.

Zilber A. L. — Bazele imunologiei, trad. Editura medicală, Bucureşti, 1959.

Zinsser H., Enders S. F., Fothergill L. D. — Immunity; Principles and Application in Medicine and Public Health, Ed. Mac Millan, New York 1939.

Zinsser H. — Bacteriology, ed. a 11-a, Appleton-Century-Crofts, New York 1957.

Au mai fost consultate: buletinele şi rapoartele Organizaţiei mondiale a sănătăţii, buletinele internaţionale de nomenclatură şi taxonomie, precum şi numeroase articole apărute în revistele de specialitate romîne şi străine.

Tulpini tip „Vi”	A	B1	B2	B3	C1	C2	C3	C4	C5	C6	
A	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	
B1	—	CL	—	+++s	—	+	++	+++s	—	—	
B2	+++s	±	CL	+++m	+++	—	—	—	—	—	
B3	+++s	+++	SCL	CL	SCL	++	++	+++	+++	+	
C1	—	—	++s	±s	CL	CL	CL	CL	CL	CL	
C2=33	—	—	—	—	—	CL	+++	±	—	—	
C3=30	—	—	—	—	—	CL	CL	+++s	±m	—	
C4	—	—	—	—	—	—	—	CL	—	—	
C5	—	—	—	—	—	—	—	—	CL	—	
C6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	CL	
C7	—	—	—	—	+++	—	—	+++m	+m	+++m	
C8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
C9	—	—	±m	±m	+++s	+++	+++	+++	+++	—	
D1	—	±m	—	±m	—	CL	—	—	—	—	
D2	—	—	—	—	—	±m	—	—	—	—	
D4	—	—	—	—	—	±	—	—	—	—	
D5	—	±m	—	±m	—	±m	—	—	—	—	
D6	—	—	—	—	—	SCL	—	—	—	—	
D7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
D8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
E1	—	±m	—	+s	—	±m	+m	—	±m	—	
E2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
E3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
E4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
E5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
E6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
E7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
E8=31	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
E9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
F1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
F2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
G	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
H	±s	++s	+s	+s	±s	+++	++m	+++m	+++m	—	
J	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
K	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
L1	—	±m	—	—	—	±m	—	±m	±m	—	
L2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
M	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
N	+++	—	±	±	+++	—	—	—	—	—	
O	±m	—	—	—	—	+++	—	SCL	—	—	
T	—	+++	—	±	—	+++m	+++	+++s	++	—	
25	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
26	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
27	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
28	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
29	—	++s	—	±s	—	CL	CL	+	—	—	
32	—	—	—	—	—	±	—	—	—	—	
35	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
34	—	+++s	—	—	—	—	—	—	—	—	
36	—	—	—	—	—	—	—	+++m	—	++	++
37	—	—	—	—	—	±m	—	±m	—	—	
38	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
39	—	±s	—	±s	—	++s	—	++s	+++	—	
40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
41	±s	+++s	+s	++s	+s	+++m	++s	+++m	++m	±m	
42	—	—	—	—	—	—	—	CL	—	+++m	++

C6	C7	C8	C9	D1	D3	D4	D5	D6	D7	D8	E1	E2
CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL
–	+m	+m	+++m	–	–	–	–	+++m	–	–	±	–
–	–	+++	+++m	+++m	+++m	+++m	+++m	–	+++m	+++	+++m	+++
+	+	++	SCL	+++m	+++m	+++m	+++m	±	+++s	+++s	SCL	+++s
CL	CL	CL	CL	+s	±m	±m	–	–	±m	–	±m	–
–	±m	±	+++m	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	±s	+m	+++s	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
CL	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
+++m	CL	+++m	±m	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	±m	CL	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	±s	–	CL	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	–	++m	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	–	–
–	–	–	–	±m	CL	±m	±m	±m	–	–	–	–
–	–	–	–	+m	±m	CL	±s	++m	–	–	–	–
–	–	–	–	–	±m	±m	CL	CL	–	CL	–	–
–	–	–	–	–	–	–	–	CL	–	–	–	–
–	–	–	–	–	–	+++s	–	–	CL	++m	–	–
–	–	–	+++m	–	–	+++s	–	–	+++s	CL	–	–
–	–	–	±m	–	–	–	–	±m	–	–	CL	CL
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	CL
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	–	–	–	–	–	–	±m	–	–	–	–
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	±m	±m	+++s	–	–	±	±	–	–	–	±m	–
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	–	±m	±s	±m	–	–	±m	±m	–	–	–
–	–	±	±m	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	–	SCL	++	+++	+++	+++	–	+++m	+++m	–	–
–	–	–	+++	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	–	–	±m	–	–	–	+++m	–	–	–	–
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	SCL	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	±m	±m	SCL	+	±m	–	–	CL	+++	–	–	–
–	–	–	±s	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
++	+++m	±	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	–	±m	–	–	–	–	–	±	–	–	–
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	–	±m	–	±s	±m	±s	+s	++s	–	±s	–
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
±m	±m	++m	+++s	++m	+++m	++m	+m	+++m	++m	+m	+s	±s
+++m	+++s	+++s	+++m	–	–	–	–	–	+++m	–	–	–

	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	F1	F2	G
	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL
	±	–	–	–	+m	++m	±	–	++	–	+++	–
+	+++m	+++	+++	–	+++m	+++m	–	+++	–	+++	–	+++
s	SCL	+++s	SCL	SCL	+++s	SCL	+++s	SCL	+++s	SCL	+++m	SCL
	±m	–	±s	+m	–	–	+m	–	±s	±s	+s	+s
	–	–	–	–	–	–	–	–	++m	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	++m	–	+++m	–	+++m	–
	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	±s	–	–	–	–
	–	–	±m	–	–	–	–	–	–	–	–	±m
	–	–	CL	+++m	–	–	–	–	CL	–	–	+s
	–	–	±m	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	–	±	–	–	–
	–	–	+++m	+++m	–	–	–	–	CL	–	+s	–
	–	–	–	–	–	–	–	–	+++m	–	–	–
n	–	–	++	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	–	–	–
	–	CL	±m	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	CL	CL	–	–	–	–	SCL	–	–	–
	–	–	–	CL	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	CL	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	CL	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	CL	–	CL	–	+s	–
	–	–	–	–	–	–	–	CL	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	+++m	–	CL	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	–	–	CL	CL	–
	–	–	–	–	–	–	–	–	–	±m	CL	–
	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	CL
	±m	–	±	±m	±m	±m	±m	–	–	±m	±m	±
	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	±m	–	–	±s	±m	–	–	–	±m	–
	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
n	–	–	SCL	SCL	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	SCL	–	–	–	+++m	–
	–	–	–	–	–	–	+++	–	+++	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	SCL	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	CL	–	CL	±	CL	±m
	–	–	–	–	CL	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	–	±	+	–	–	±m	–	±m	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	±s	–	±m	±m	–	–	±m	–	±m	–	–	±m
	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	+s	±s	+++s	+++m	±m	+s	+++m	±s	+++s	+s	±m	+s
	–	–	–	–	–	–	SCL	–	–	–	+++	–

H	J	K	L1	L2	M	N	O	T	25	26	27	28
CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL
—	—		—	—	+++m	±m	++m	±	—	+++m	±	+++
+++	+++m	+++m	++	+++m	+++	SCL	++	+++s	+++m	CL	SCL	SCL
CL	+++s	SCL	SCL	SCL	+++s	CL	SCL	CL	+++m	CL	SCL	CL
±s	±s	+m	±s	±s	±m	—	—	+s	—	+s	—	++s
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+m	—	—
±m	—	—	—	—	±m	—	—	++m	—	±	—	++m
—	—	—	—	—	—	+m	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	±s	—	±s	—	±m	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±s	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CL	±m	—	±m	±s	±s	+s	±s	++s	±m	+++s	—	+++s
—	CL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	CL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	CL	CL	—	—	—	—	—	±s	—	±m
—	—	—	+++m	CL	—	—	—	±m	—	±	—	±m
—	—	—	—	—	CL	—	—	±m	—	—	—	±m
—	—	—	—	++	—	CL	—	±m	—	—	—	—
—	—	—	—	—	+++	—	CL	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	CL	—	—	—	CL
—	—	—	—	—	—	—	—	—	CL	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	CL	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	CL	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	CL
±m	—	—	—	—	—	—	±	—	—	±s	—	+++s
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	±	—	±m	—	+m
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
±m	—	—	—	—	—	±m	—	±m	—	±s	—	±s
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
++s	—	+s	±s	—	+s	++s	+s	+++s	+s	++s	±s	+++m
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Tabelul XLII

28	29	32	34	35	36	37	38	39	40	41	42	Tulpini tip „Vi”
CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	A
+++	+++	—	±m	±m	+++m	—	+++m	—	+++m	—	+++m	B1
SCL	—	+++m	—	++	—	+++m	CL	+++m	—	+++m	—	B2
CL	++	SCL	+++s	+++	±	SCL	CL	+++s	+++m	+++s	+++m	B3
++s	±s	—	—	—	++s	—	+++m	+s	+++m	±s	—	C1
—	—	—	—	—	+s	—	—	—	+++m	—	—	C2=33
—	+m	—	—	—	+++m	—	—	—	SCL	—	—	C3=30
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	C4
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	C5
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	C6
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	C7
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	C8
++m	—	—	±m	—	—	—	+++m	±	—	—	—	C9
—	—	—	—	—	—	—	+m	—	±m	—	—	D1
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	D2
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	D4
—	—	—	—	—	±m	—	±m	—	—	—	—	D5
—	—	—	—	—	+++m	—	—	—	+++m	—	—	D6
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	D7
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	D8
—	—	—	—	—	—	—	++m	—	±m	—	—	E1
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	E2
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	E3
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	E4
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	E5
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	E6
—	—	—	—	—	±s	—	—	—	++m	—	—	E7
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	E8=31
—	—	—	—	—	—	—	—	—	++m	—	—	E9
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	F1
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	F2
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	G
+++s	++s	±m	—	—	+	+m	+++s	±	+++m	±	+m	H
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	J
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	K
±m	—	—	—	—	±m	—	±	—	±s	±	—	L1
±m	—	—	—	—	—	—	+m	—	—	—	—	L2
±m	—	—	—	—	—	—	±m	—	—	—	—	M
—	—	—	—	—	—	—	±m	—	—	—	—	N
—	+++m	—	—	—	CL	—	—	—	CL	—	+++m	O
CL	—	—	—	—	+++	—	±	SCL	±m	—	—	T
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	25
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	26
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	27
CL	—	—	—	—	—	—	—	+++m	—	—	—	28
+++s	CL	—	+++	++s	CL	—	+++s	±m	CL	—	SCL	29
—	—	CL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	32
—	—	—	CL	++	+	±	CL	—	±	—	—	34
—	—	—	—	CL	+m	—	CL	—	+	—	—	35
—	—	—	—	±	CL	—	—	—	CL	—	++	36
+m	—	—	—	—	+	CL	+s	—	—	—	—	37
—	—	—	—	—	—	—	CL	—	—	—	—	38
±s	—	—	—	—	±	—	+++s	CL	+s	—	—	39
—	—	—	—	—	—	—	—	—	CL	—	—	40
+++m	+s	±s	—	±m	+++s	±m	+++s	±m	+++m	CL	++s	41
—	+++	—	+++s	SCL	CL	—	—	—	CL	—	CL	42